



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

FACTORES QUE AFECTAM AS TAXAS DE GESTAÇÃO APÓS A TRANSFERÊNCIA DE  
EMBRIÕES EQUINOS

NARA ASSAF FRANÇA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

**Presidente**

Doutor Luís Lopes da Costa

**Vogais**

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutora Luísa Maria Leal Mateus

Dr<sup>a</sup>. Maria Augusta Alonso

**ORIENTADOR**

Dr<sup>a</sup>. Maria Augusta Alonso

**CO-ORIENTADOR**

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

2011

LISBOA

---





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

FACTORES QUE AFECTAM AS TAXAS DE GESTAÇÃO APÓS A TRANSFERÊNCIA DE  
EMRBIÕES EQUINOS

NARA ASSAF FRANÇA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

**Presidente**

Doutor Luís Lopes da Costa

**ORIENTADOR**

Dr<sup>a</sup>. Maria Augusta Alonso

**Vogais**

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutora Luísa Maria Leal Mateus

**CO-ORIENTADOR**

Dr<sup>a</sup>. Maria Augusta Alonso

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

2011

LISBOA

---

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, por serem o meu exemplo de força e perseverança. Nos momentos de desânimo olho para vocês e vejo tudo o que se pode alcançar com determinação e vontade. Obrigada pelo apoio constante e por me ensinarem como se superam os obstáculos.

*Os ventres das éguas são como cofres repletos de ouro*  
*(Emir Abd-el-Kader)*

## **AGRADECIMENTOS**

À Dr.<sup>a</sup> Maria Augusta Alonso, por me ter acolhido quando mais precisei, por ser um exemplo de profissional e de pessoa.

À Professora Doutora Graça Ferreira Dias por toda ajuda fornecida na construção desta dissertação e pela simpatia e disponibilidade com que o faz.

Ao Professor Doutor Rubens Paes de Arruda por todos os ensinamentos ao longo do estágio e pela confiança que depositou em mim.

Ao Dr. Miguel Seta de Carvalho pela paciência, disponibilidade, ensinamentos e amizade.

Ao Professor Doutor Telmo Nunes pelas inúmeras horas que dedicou ao processamento dos meus dados e pela simpatia com que sempre me recebeu.

Ao Gilberto Pollina pela capacidade de estar tão perto mesmo estando tão longe.

Aos meu amigos que sempre me apoiaram sobretudo, à Fernanda Jordão pela ajuda constante durante o estágio e dissertação, a Dr.<sup>a</sup> Ana Matias, Lourdes Medeiros, Inês, Jessica e Susana

À Dona Elisa Luz por toda a ajuda que me deu na procura de artigos.

A todas as pessoas que acompanharam o meu percurso académico, família e amigos, que directa ou indirectamente contribuíram para a minha felicidade. O meu muito obrigado.

**TÍTULO:** Factores que afectam as taxas de gestação após a transferência de embriões equinos.

**RESUMO:**

O sucesso de um programa de transferência de embriões resulta da interacção entre os factores que afectam a recolha do embrião e os factores que afectam a gestação após a transferência dos mesmos. A análise dos factores que poderão ter influência nas taxas de gestação pode ser muito útil para compreensão dos aspectos a melhorar em um programa específico de transferência de embriões, maximização de lucros e gestão de expectativas. Foram analisados dados relativos a 127 transferências de embriões de três épocas reprodutivas consecutivas entre 2008 e 2011 de um centro localizado no interior de São Paulo, Brasil.

Os seguintes factores foram examinados em relação ao possível efeito na taxa de gestação após a transferência e morte embrionária, sendo alguns relacionados com as receptoras e outros relacionados com o embrião: época reprodutiva, ovulação do ano, qualidade da receptora que foi definida em função do tónus e morfoecogenicidade uterina e tipo de cio (natural ou artificial). Em relação aos factores relacionados com os embriões analisou-se o estadio de desenvolvimento do embrião, o diâmetro do embrião antes da transferência e a qualidade morfológica. As variáveis foram examinadas pelo teste exacto de Fisher em tabelas de contingência 2 X 2 e as diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ . Os valores obtidos nas taxas de gestação ao longo das três épocas aos 45 dias de gestação foram 51,4%, 38,5% e 50% respectivamente. Nenhuma das variáveis analisadas influenciou de modo significativo nas taxas de gestação. No entanto, a qualidade da receptora e a qualidade do embrião foram as variáveis que apresentaram maior diferença na proporção entre éguas gestantes e não gestantes. (69,4% de éguas gestantes "aceitáveis" *versus* 33,3% de éguas gestantes "marginais" e 53,8% de éguas gestantes de embriões classificados de grau 1 e 2 *versus* 22,2% de éguas gestantes de embriões de grau 3 e 4)". Uma vez que as condições de manejo, as ambientais, o tipo de animais usados e os embriões adquiridos são todos diferentes, não se podem estabelecer correlações directas entre os vários programas de transferência de embriões mas apenas uma tendência pelo que se recomenda uma análise específica para cada centro.

**PALAVRAS-CHAVE:** transferência de embriões; taxas de gestação; eficiência programa

**TITLE:** Factors affecting pregnancy rates after equine embryo transfer.

**ABSTRACT:**

The success of a program of embryo transfer is the result of the interaction between the factors that affect the collection of the embryo and the factors that affect the gestation after the respective transfer. The analysis of the factors that may have an influence on the rates of pregnancy can be highly valuable for the understanding of the aspects to be improved in a specific program of embryo transfer, optimizing the gains and managing expectations. We have analyzed the data pertaining to 127 embryo transfers of three consecutive reproductive seasons between 2008 and 2011 in a center located in inner São Paulo, Brazil. Many factors were examined for effects upon the pregnancy rate after the transfer and the embryonic death, some of these were related to the receptors and some related to the embryo. The effect of the reproductive season, the ovulation of the year, the quality of the receptor, defined in function of the tonus and uterine morphoecogenicity, and type of heat cycle was examined in relationship to the possible effect on the gestation rate after the transfer and embryonic death. In regards to the embryonic-factors we analyzed the stage of embryo development, the diameter of the embryo before and after transfer and the morphological quality.

All the variables were examined according to the exact Fisher test in contingency charts 2 x 2 and the differences were considered significant if  $p < 0.05$ . The pregnancy rates obtained for the three seasons at 45 days of gestation were, respectively, 51.4%, 38.5% and 50%. None of the analyzed variables had a significant influence on the pregnancy rates. However, the quality of the receptor and the quality of the embryo were the variables that showed greatest difference as far as the ratio of gestating to non-gestating mares (69.4% of “acceptable” pregnant mares versus 33.3% “marginal” pregnant mares and 53.8% of embryos classified as Grade-1 and 2 versus 22.2% of pregnant mares with embryos classified as Grade 3/4). Since the working conditions, the environment, the type of animals used and the collected embryos are all different we could not establish a direct connection between the various programs of embryo transfer but rather a tendency and therefore recommend a specific analysis for each center.

**KEYWORDS:** embryo transfer; pregnancy rates; reproductive efficiency

## ÍNDICE

Índice de gráficos.....	vi
Índice de figuras.....	vi
Índice de tabelas.....	vii
Lista de abreviatura.....	ix
I. Introdução.....	1
II. Relatório de estágio.....	2
1- Actividades realizadas.....	2
1.1 Universidade de São Paulo.....	2
1.2 Fazenda Santa Rita II.....	4
1.3 Centro hípico Vale do Choupal.....	9
III. Revisão de Literatura.....	11
1. Introdução à transferência de embriões.....	11
2. Indicações à transferência de embriões.....	12
3. Fundamentos da recolha e transferência não cirúrgica de embriões.....	13
3.1 Embrião equino.....	13
3.2 Recolha do embrião.....	13
3.3 Identificação e avaliação do embrião.....	15
3.4 Transferência do embrião.....	16
3.5 Refrigeração e transporte.....	18
4. Factores que influenciam o sucesso de um programa de transferência de embriões.....	19
4.1 Factores que influenciam a recolha.....	19
4.1.1 Endometrite.....	20
4.1.2 Morte embrionária precoce.....	21
4.1.2.1 Factores Intrínsecos.....	22
4.2 Factores que influenciam a taxa de gestação após a transferência.....	22
4.2.1 Embrião.....	23
4.2.2 Técnica de transferência.....	25
4.2.3 Sincronia receptora-dadora.....	25
4.2.4 Receptoras: outros aspectos importantes.....	28
5. Limitações à técnica.....	29
5.1 Superovulação.....	29
5.1.1- Extracto pituitário equino (EPE).....	30
5.1.2- FSH.....	30
5.1.3- Vacinação contra a inibina.....	31
5.2 Criopreservação de embriões.....	31
6. Outras técnicas reprodutivas assistidas.....	34



6.1 Transferência de oócitos.....	34
6.2 Fertilização <i>In Vitro</i> .....	35
IV. Trabalho experimental.....	38
1. Materiais e métodos.....	38
1.1 Animais e manejo.....	38
1.2 Análise estatística.....	40
2. Resultados.....	42
2.1 Época.....	42
2.2 Factores relacionados com as receptoras.....	44
2.2.1 Ovulação do ano.....	44
2.2.2 Tipo de cio.....	46
2.2.3 Qualidade da receptora.....	47
2.3 Factores relacionados com os embriões.....	48
2.3.1 Estádios de desenvolvimento.....	49
2.3.2 Diâmetro do embrião.....	50
2.3.3 Qualidade morfológica.....	51
3. Discussão dos resultados.....	52
3.1 Época.....	52
3.2 Factores relacionados com as receptoras.....	53
3.2.1 Ovulação do ano.....	53
3.2.2 Tipo de Cio.....	53
3.2.3 Qualidade da receptora.....	54
3.3 Factores relacionados com o embrião.....	55
3.3.1 Estádios de desenvolvimento.....	55
3.3.2 Diâmetro do embrião.....	55
3.3.3 Qualidade do embrião.....	56
3.4 Outros factores com influência na taxa de gestação após a transferência do embrião.....	56
3.4.1 Idade das receptoras.....	57
3.4.2 Idade das dadoras.....	57
3.4.3 Tipo de armazenamento do embrião após a recolha.....	58
3.4.4 Tratamento indutor da ovulação.....	58
V. Conclusão.....	60
VI. Bibliografia.....	61
VII. Anexos.....	68

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Influência da época reprodutiva na taxa de gestação.....	43
Gráfico 2: Influência da época reprodutiva na morte embrionária.....	43
Gráfico 3: Influência da ovulação do ano na taxa de gestação no total das épocas reprodutivas.....	45
Gráfico 4: Influência da ovulação do ano na taxa de gestação na época de 2010/2011....	45
Gráfico 5: Influência do tipo de cio na taxa de gestação no total das épocas reprodutivas.....	46
Gráfico 6: Influência do tipo de cio na taxa de gestação na época de 2010/2011.....	46
Gráfico 7: Influência da qualidade da receptora na taxa de gestação no total das épocas reprodutivas.....	47
Gráfico 8: Influência da qualidade da receptora na taxa de gestação na época reprodutiva de 2010/2011.....	47
Gráfico 9: Influência do estadio de desenvolvimento do embrião na taxa de gestação no total das épocas reprodutivas.....	49
Gráfico 10: Influência do estadio de desenvolvimento do embrião na taxa de gestação na época reprodutiva de 2010/2011.....	49
Gráfico 11: Influência do diâmetro do embrião na taxa de gestação no total das épocas reprodutivas.....	50
Gráfico 12: Influência do diâmetro do embrião na taxa de gestação na época reprodutiva de 2010/2011.....	50
Gráfico 13: Influência da qualidade morfológica do embrião na taxa de gestação no total das épocas reprodutivas.....	51
Gráfico 14: Influência da qualidade morfológica do embrião na taxa de gestação na época reprodutiva de 2010/2011.....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diagnóstico de gestação Dia 14 (D14).....	3
Figura 2: Recolha de embrião D14.....	3

Figura 3: Recolha de sémen e material para processamento do mesmo.....	4
Figura 4: Fazenda Santa Rita II.....	5
Figura 5: Lote das éguas paridas.....	5
Figura 6: Tronco de contenção para recolha e transferência de embriões.....	7
Figura 7: Laboratório adjacente aos troncos.....	7
Figura 8: Principal material necessário para a recolha de embriões.....	8
Figura 9: Higienização da zona do períneo da égua.....	8
Figura 10: Líquido da lavagem.....	8
Figura 11: Embrião na placa de Petri.....	8
Figura 12: Blastocisto expandido.....	8
Figura 13: Centro de reprodução em Vila Chã de Ourique.....	9
Figura 14: Romaria da Moita.....	10
Figura 15: Embrião equino e ponta do catéter de transferência à lupa.....	16
Figura 16: Palhinha carregada.....	17
Figura 17: Estádios de desenvolvimento e classificação do embrião equino.....	24

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Casos particulares observados na fazenda Santa Rita.....	6
Tabela 2: Actividades realizadas aquando do acompanhamento do Dr. Miguel Carvalho.....	10
Tabela 3: Sistema de classificação de embriões equinos.....	23
Tabela 4: Complexidade, custo e taxas de sucesso em técnicas de reprodução assistidas usadas na prática equina.....	34
Tabela 5: Variáveis analisadas com eventual influência na taxa de gestação.....	42
Tabela 6: Taxas de gestação e morte embrionária consoante a época.....	43

Tabela 7: Influência da égua receptora nas taxas de ovulação e morte embrionária no total das épocas reprodutivas.....	44
Tabela 8: Influência da égua receptora nas taxas de gestação e morte embrionária na época reprodutiva de 2010/2011.....	44
Tabela 9: Influência do embrião nas taxas de gestação e morte embrionária no total das épocas reprodutiva.....	48
Tabela 10: Influência do embrião nas taxas de gestação na época reprodutiva de 2010/2011.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µm- micron

%- Percentagem

ACTH- hormona adrenocorticotrópica

AFA- academia da força aérea

BH- Brasileiro de hipismo

°C- graus Célsius

cc- centímetros cúbicos

cm- centímetros

CL- corpo lúteo

CO<sub>2</sub>- Dióxido de Carbono

D- dia

eCG- gonadotrofina coriônica equina

eFSH- hormona folículo-estimulante equina

EPE- extracto pituitário equino

EUA- Estados Unidos da América

FIV- Fertilização In Vitro

FSH- hormona folículo-estimulante

GIFT- transferência de gâmetas intrafalopiana

GnRh- hormona libertadora de gonadotrofina

h- horas

ha- hectares

hCG- gonadotrofina coriônica humana

IA- inseminação artificial

ICSI- injeção intracitoplasmática de sémen

IV- endovenosa

Kg- quilogramas

L- litros

LH- hormona luteinizante

mg- microgramas

min- minutos

mm- milímetro

N<sub>2</sub>- Azoto

O<sub>2</sub>- Oxigénio

OT- transferência de oócitos

PCR- reacção polimerase em cadeia

PGE2 - prostaglandina E2

PGF2 $\alpha$ - prostaglandina 2 $\alpha$

PSI- Puro-Sangue Inglês

reFSH- hormona folículo-estimulante equina recombinante

TE- transferência de embriões

TO- transferência de oócitos

USP- Universidade de São Paulo

## **I. Introdução**

Entende-se por transferência de embriões (TE) o procedimento através do qual se recolhe um ou mais embriões através de uma lavagem uterina transcervical de uma égua dadora, inseminada ou coberta por monta natural, e se transfere para o útero de uma égua receptora previamente sincronizada (Losinno 2010).

A transferência de embriões é actualmente aceite como uma ferramenta importante para aumentar o número de descendentes de uma égua com elevado valor genético, produzir poldros de éguas com uma carreira desportiva sem ter que interrompê-la e obter poldros de éguas que seriam incapazes de levar a termo a gestação (Stout, 2006).

Em retrospectiva verificou-se um longo intervalo entre a primeira transferência de embriões equinos (Oguri e Tsutsumi, 1974) e o seu uso comercial na prática clínica na Argentina, anos 90.

O maior obstáculo à expansão comercial da TE prendeu-se com a dificuldade em superovular éguas e a pouca tolerância dos embriões equinos à criopreservação (McCue, 2003).

Durante o período de estágio foi possível acompanhar a rotina de um centro de transferência de embriões de média escala, localizado no interior de São Paulo, Brasil. A crescente familiarização com a técnica permitiu evidenciar alguns factores que poderiam influenciar as taxas de gestação do programa de transferência de embriões e consequentemente o sucesso do mesmo.

O sucesso de um programa de transferência de embriões resulta da interacção entre os factores que afectam a recolha do embrião e os factores que afectam a gestação após a transferência dos mesmos. A presente dissertação incide sobre as variáveis com eventual influência na taxa de gestação após a transferência do embrião. Analisaram-se dados respeitantes a três épocas reprodutivas consecutivas, contabilizando um total de 127 transferências.

O objectivo deste trabalho consistiu em avaliar se as variáveis escolhidas tiveram uma influência na taxa de gestação na população de éguas em questão para que se pudessem realizar alterações que visassem aumentar o êxito do programa.

## **II. Relatório de estágio**

### **1-Actividades realizadas**

O estágio desenvolveu-se no Brasil no período de 1 de Setembro a 12 Dezembro de 2010, na Universidade de São Paulo (USP), campus de Pirassununga e na Fazenda Santa Rita II, onde foram recolhidos os dados para a realização da presente dissertação. No período de 10 de Fevereiro a 19 de Maio, foi realizado um estágio com o Dr. Miguel Seta de Carvalho na sua actividade profissional em clínica e reprodução equina na zona de Vila Chã de Ourique e arredores.

#### **1.1 Universidade de São Paulo**

Numa primeira fase, durante os meses de Setembro e Outubro o estágio foi realizado na Universidade de São Paulo (USP) - Brasil, campus de Pirassununga, nomeadamente no centro de Biotecnologia e Reprodução Animal sob orientação do Professor Doutor Rubens Paes de Arruda. O centro tem uma área aproximada de 210.000m<sup>2</sup> que abrange laboratórios de fisiologia e endocrinologia molecular, biotecnologia do sêmen e andrologia, biotecnologia de ovinos e caprinos, sala para colheita de sêmen e embriões, curral aberto para manejo em tronco de contenção de 8 animais concomitantemente, 4 salas para docentes e sala para aulas teóricas, 12 paddocks (12.000m<sup>2</sup>), 6 pastos (17.6 ha) e capineiras (2 ha), ou seja, pastos cultivados com capim, espécie forrageira de países com clima tropical. Conta, ainda, com equipamento de investigação com ecógrafo e sistemas "Heat-watch" para diagnóstico de cio de vacas por telemetria.

Neste local acompanhou-se a rotina diária de prestação de serviços de reprodução em equinos e bovinos de corte (Nelore) e de leite (Holstein). Entre os locais onde se prestaram os referidos serviços encontram-se o campus, a área correspondente à academia da Força Aérea (AFA) na cidade de Pirassununga, algumas explorações bem como duas coudelarias da região.

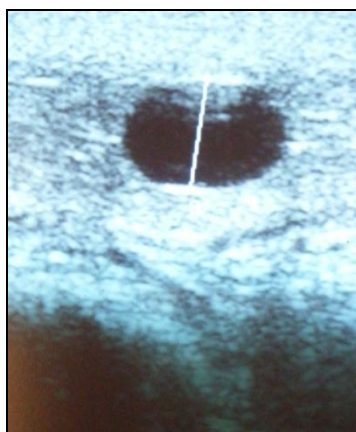
Apesar de não corresponder totalmente à temática da presente dissertação, o acompanhamento de bovinos foi possível pois no início do mês de Setembro muitas éguas encontravam-se, ainda, em anestro ou em transição. Entre as actividades predominantemente desenvolvidas com os bovinos conta-se a sincronização de cios através da utilização de dispositivos intravaginais, inseminação artificial, diagnóstico de gestação bem como de doenças de foro ginecológico diagnosticáveis por ecografia, doseamento hormonal entre outros. Acompanhou-se, ainda, o exame andrológico dos touros que iriam ser utilizados na época de monta do gado de corte no campus.



Em relação às éguas, houve a possibilidade de realizar palpções transrectais, utilizar o ecógrafo para controlo da dinâmica folicular, diagnóstico de gestação, controlo da égua no pós-parto, recolhas periódicas de sangue para doseamento hormonal, inseminação artificial bem como participar em ensaios científicos de teses de doutoramento. Deste modo assistiu-se à recolha de embriões com 14 dias (figura 1 e 2) bem como ao acompanhamento da parte laboratorial associada a este ensaio, nomeadamente a determinações de expressão génica por reacção polimerase em cadeia (PCR). Foi ainda possível acompanhar a rotina de reprodução num haras de cavalos da raça Brasileiro de Hipismo (BH).

Em relação aos machos, foi possível a recolha de sémen de garanhões e auxiliar no processamento de congelação do mesmo (figura 3).

**Figura 1:** Diagnóstico de gestação Dia 14 (D14).



**Figura 2:** Recolha de embrião D14.



**Figura 3:** Recolha de sémen e material para processamento do mesmo.



Neste local o dia de trabalho começava às 7h30 e acabava às 17h30. Nos momentos de maior tranquilidade éramos incentivados ao estudo para consolidação de fundamentos teóricos através da leitura de livros e artigos científicos. Pôde-se ainda assistir e dar apoio a três dias de aulas teórico-práticas de reprodução e obstetrícia, leccionadas pelo Professor Doutor Rubens Paes de Arruda, ao segundo ano da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

## **1.2 Fazenda Santa Rita II**

Numa segunda fase, durante os meses de Novembro e Dezembro, o estágio decorreu na fazenda Santa Rita, um centro de transferência de embriões cuja proprietária e Médica Veterinária, Dr<sup>a</sup>. Maria Augusta Alonso, é também criadora de cavalos Mangalarga Paulista. Pôde-se, ainda, assistir a um simpósio de reprodução que decorreu na Universidade de São Paulo nos dias 4 e 5 de Dezembro de 2010.

A fazenda Santa Rita II (figura 4) localiza-se na cidade de Piracaia no interior de São Paulo. Com uma extensão de 120 hectares possui cerca de 130 equinos entre eles éguas (dadoras e receptoras), poldros e garanhões separados por lotes consoante o seu tipo e as suas necessidades nutricionais como por exemplo, lote das gestantes, lote das paridas (figura 5), lote das receptoras, etc.

**Figura 4:** Fazenda Santa Rita II.



**Figura 5:** Lote das éguas paridas.



O regime de alojamento é variável conforme o animal. As receptoras vivem em regime extensivo, com pasto abundante à disposição, suplementado com sais minerais. A maioria das dadoras dorme na boxe e são libertadas durante o dia na pastagem. À sua alimentação é adicionado alimento composto consoante as suas necessidades. Os poldros vivem em regime extensivo e são recolhidos de manhã e à noite para o fornecimento do alimento composto. Desde modo é possível um acompanhamento a nível individual dos animais o que permite a identificação precoce de eventuais problemas e a resolução atempada dos mesmos. Os garanhões presentes na propriedade dormem na boxe e são soltos durante o dia em padocks num sistema rotativo.

A rotina diária é flexível consoante o tipo de trabalho a realizar. No entanto, na maioria das vezes começa às 7h15 e acaba por volta das 17h30, de segunda a sábado e alguns domingos. A fazenda Santa Rita oferece como serviços a transferência de embriões, aluguer de receptoras para transferência de embriões, inseminação artificial tanto com sémen fresco como congelado e penso, sobretudo a cavalos que acabaram a sua carreira desportiva. Além

dos cavalos de raça Mangalarga trabalha-se ainda com cavalos Quarto de Milha, Árabes e Brasileiro de Hipismo.

Diariamente, realiza-se o exame ecográfico dos animais, previamente escolhidos com base nas suas fichas clínicas. Todos os dados relevantes são anotados num caderno e no final do dia estas informações são transcritas para as fichas clínicas dos respectivos animais. Deste modo anotam-se as dimensões dos folículos dos dois ovários, evidência de uma ovulação, eventual presença de líquido intrauterino, quistos paraovarianos, grau de edema uterino e dobras endometriais, administração de fármacos e, caso se trate de um diagnóstico de gestação, se é positivo ou negativo e se existe batimento cardíaco associado bem como qualquer outra informação relevante.

No caso das receptoras candidatas a receberem um embrião, eram analisados outros parâmetros como a tensão uterina, a presença de corpo lúteo e a avaliação da morfoecogenicidade do útero. Com base na ficha clínica dos animais bem como na necessidade de utilização das receptoras, tomavam-se decisões respeitantes à indução hormonal da ovulação nomeadamente com gonadotrofina coriónica humana (hCG) ou Deslorelina. A escolha do indutor era baseada no momento da época reprodutiva (primeiro ciclo da época ou não) e na resposta anterior do animal ao fármaco utilizado, sendo por vezes utilizados ambos os fármacos em simultâneo. Na rotina habitual procedia-se à administração de progesterona de longa acção em éguas gestantes cuja transferência do embrião era difícil ou nas quais foram afectadas por alguma patologia que compromettesse a saúde geral do animal e respectiva gestação, bem como qualquer outro tratamento necessário tal como lavagens uterinas, vacinações e inúmeras desparasitações.

Durante o período de estágio houve ainda a oportunidade de acompanhar algumas situações específicas como claudicações, uma delas por laminite numa receptora, cólicas, realização dos primeiros cuidados aos umbigos de neonatos e mesmo a fase final de um parto. Estas situações estão quantificadas na tabela 1.

**Tabela 1:** Casos particulares observados na fazenda Santa Rita.

Área de intervenção	Nº de casos observados
Acompanhamento neonatos	5
Afecções músculo-esqueléticas	2
Cólicas	3
Aparelho respiratório	1
Abortos	1
Partos	1

Além das palpações transrectais e exames ecográficos diários do aparelho genital feminino, procedeu-se à recolha de sémen dos garanhões presentes na exploração e respectiva inseminação das éguas e, por vezes, monta natural sobretudo com um garanhão Bretão para obtenção de descendentes para trabalho na fazenda.

Era muito frequente receber-se sémen, sobretudo refrigerado, para a inseminação das dadoras de embrião. O sémen provinha de garanhões previamente escolhidos pelos proprietários consoante os seus atributos. Como tal foi possível observar inúmeras inseminações bem como foi-nos dada a possibilidade de executar este procedimento.

De um modo geral, a ovulação era induzida nas dadoras e estas eram inseminadas com o sémen estipulado. Procedia-se, no dia seguinte, à confirmação da ovulação. Se esta não se verificasse nas 48h seguintes, realizava-se uma nova inseminação. Após a detecção da ovulação contavam-se 7 ou 8 dias para a recolha do embrião e sua transferência para a égua receptora que acontecia sempre nas 24h seguintes. Tentava-se sempre ter várias opções de receptoras para cada dadora uma vez que, caso a receptora não mostrasse uma boa condição de cérvix, tónus uterino e o corpo lúteo inadequado no momento da transferência se pudesse utilizar outra.

Para a recolha dos embriões, a égua dadora era colocada num tronco de contenção (figura 6) localizado ao lado do laboratório (figura 7). Fazia-se a contenção da cauda e higienização da zona perineal com água e detergente neutro (figura 9). De seguida a zona era seca.

Eram colocados à disposição cerca de 6 Litros (L) de Lactato de Ringer à temperatura ambiente para utilização na lavagem uterina para a recolha dos embriões (figura 8 e 10). Não se procedia ao aquecimento do Lactato de Ringer pois a temperatura do meio ambiente encontrava-se em torno dos 36°C, sendo esta suficiente para elevar a temperatura do líquido a uma temperatura confortável.

**Figura 6:** Tronco de contenção para recolha e transferência de embriões.



**Figura 7:** Laboratório adjacente aos troncos.





**Figura 8:** Principal material necessário para a recolha de embriões.



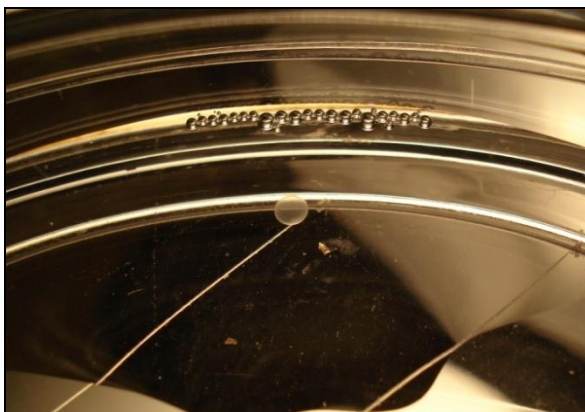
**Figura 9:** Higienização da zona do períneo da égua.



**Figura 10:** Líquido da lavagem.



**Figura 11:** Embrião na placa de Petri.



**Figura 12:** Blastocisto expandido.



Imagens da autora

Após a transferência de embriões, as éguas receptoras eram examinadas ao 12º dia para confirmação da gestação. Em caso positivo, eram transferidas para o grupo das éguas gestantes. Novas ecografias eram realizadas ao 21º dia para verificação do batimento cardíaco, 35º e 45º dia para controlo da gestação e diagnóstico de eventual perda embrionária. Depois do 45º dia as éguas eram deslocadas para a propriedade do dono do embrião, onde ficavam à sua responsabilidade.

### 1.3 Centro hípico Vale do Choupal

O último período de estágio decorreu durante os meses de Fevereiro a Maio através do acompanhamento da actividade profissional do Dr. Miguel Seta de Carvalho em clínica equina, sobretudo em reprodução nas zonas de Santarém, Caldas da Rainha, Óbidos entre outras.

O Dr. Miguel Seta de Carvalho é o responsável pela publicação do Anuário Português de Garanhões onde fornece aconselhamento técnico de apoio à selecção, disponibilização de sémen e recepção de éguas para inseminação artificial. Além disso, possui actualmente um centro de reprodução localizado no centro hípico Vale do Choupal, em Vila Chão de Ourique - Cartaxo (imagem 13). O centro está capacitado para receber cerca de 30 éguas afilhadas ou não, distribuídas por paddocks e boxes controladas.

**Figura 13:** Centro de reprodução em Vila Chã de Ourique.



Fotografias publicadas na revista Contra Barreira de Pedro Cardoso

Parte do estágio ocorreu neste centro de reprodução através do acompanhamento das éguas para posterior inseminação e diagnóstico de gestação aos 15 e 30 dias. Procedia-se, também, à recolha e avaliação do sémen de garanhões aí estabulados. No entanto, grande parte dos

serviços prestados baseava-se em ir ao encontro dos animais em casa dos proprietários. No caso das éguas procedia-se ao controlo do seu aparelho reprodutor com o auxílio do ecógrafo para posterior inseminação bem como realização de diagnósticos de gestação. No caso dos garanhões recolhia-se o sêmen que era transportado refrigerado em contentor adequado (*Minitub® refrigerator*) até às éguas estipuladas.

Além da inseminação das éguas e recolha de sêmen dos garanhões, foram executadas outras actividades relacionadas ou não com a reprodução nomeadamente inúmeras vacinações e desparasitações, castrações, assistência a neonatos, trabalhos de dentisteria entre outros. As actividades realizadas encontram-se descritas e quantificadas na tabela 2.

**Tabela 2:** Actividades realizadas aquando do acompanhamento do Dr. Miguel Carvalho

Área de intervenção	Nº de casos observados
Acompanhamento neonatos	2
Castrações	5
Cólicas	4
Dentisteria	10
Desidrataçãoes	6
Desparasitações	40
Resenho livro azul	35
Vacinação	12

Foi ainda possível acompanhar o Dr. Miguel Carvalho na prestação de serviços veterinários à Romaria a cavalo no período entre 27 de Abril a 1 de Maio com partida na Moita e chegada a Viana do Alentejo. Entre as principais áreas de actuação contaram-se as cólicas, as desidratações, os traumatismos e as claudicações.

**Figura 14:** Romaria da Moita.





### **III. Revisão de Literatura**

#### **1. Introdução à transferência de embriões**

Entende-se por Biotecnologias Reprodutivas as ferramentas e/ou processos tecnológicos que o Homem aplica de maneira directa ou indirecta sobre a reprodução (Losinno, 2010).

A primeira utilização destas ferramentas reprodutivas data de meados do século XVI mas, é a partir do século XX, que se verificou a aplicação massiva destas biotecnologias na indústria equina mundial em especial com a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE) (Squires, 2005).

O primeiro potro obtido por transferência de embriões foi produzido em 1974 por Oguri e Tsutsumi (Squires 2008<sup>1</sup>) e começou a ser realizada comercialmente a partir dos anos 80 (McKinnon, 1988). Actualmente, a recolha e transferência de embriões a fresco e refrigerado, é permitida em muitas raças. No entanto, a hesitação de algumas associações de raças em permitir o registo de múltiplos poldros obtidos por TE constituiu uma forte limitação à expansão desta biotecnologia. Porém os factores que mais condicionaram a generalização da técnica foram a percepção da dificuldade em superovular éguas e a fraca tolerância dos embriões equinos à criopreservação (Stout 2006).

Entre os países que lideram a TE encontram-se os Estados-Unidos, Brasil e Argentina. Em 1999, 1.500 poldros foram produzidos por TE nos Estados-Unidos de um total de 300.000 poldros registados anualmente. Existem, ainda, outros países que utilizam a TE mas a um nível menos extenso sendo eles a Austrália, Canadá, Itália, Alemanha e França (Squires 2003).

Em relação a Portugal, desde 2009, a Associação Portuguesa De Criadores Do Cavalo Puro Sangue Lusitano permite o uso de inseminação artificial e transferência de embriões, sendo a recolha e a transferência autorizada somente a médicos veterinários. Cada égua pode doar um número ilimitado de embriões. No entanto, só podem ser registados um máximo de três descendentes ao ano sendo que a comunicação para a utilização da égua dadora de embriões, tem de ser feita à Associação respectiva até 31 de Dezembro, precedente da época de monta (em regulamento do livro genealógico do Cavalo Lusitano, anexo V, artigos 15º a 17º, Março de 2010).

---

<sup>1</sup> Oguri N, Tsutsumi Y. Non-surgical egg-transfer in mare. J Reprod Fertil 1974;41:313-20.

## 2. Indicação à transferência de embriões

Entende-se por transferência de embriões o procedimento através do qual se recolhe um ou mais embriões através de uma lavagem uterina transcervical de uma égua dadora, inseminada ou coberta por monta natural, e se transfere para o útero de uma égua receptora previamente sincronizada (Losinno 2010).

A TE é tradicionalmente utilizada em éguas idosas que não conseguem engravidar ou quando o fazem, não levam a termo a gestação devido a morte embrionária precoce ou aborto. Este facto constitui uma forte limitação à técnica pois tais éguas apresentam uma menor probabilidade de fornecer embriões que éguas com uma saúde reprodutiva normal (Carnevale 1995). A TE tem ainda, como indicação, a produção de poldros de éguas que se encontrem em competição (corrida, espectáculos, polo, etc). Mais recentemente, esta técnica foi associada a novas tecnologias como a inseminação com sêmen congelado, técnicas de inseminação com doses baixas de espermatozóides e outras técnicas reprodutivas assistidas como transferência de oócitos e injeção espermática intracitoplasmática. A adopção destas técnicas constitui uma pressão para os investigadores desenvolverem métodos de superovulação e criopreservação de embriões e oócitos, conhecidos entraves da TE (McKinnon et al 2007). Além disso, a TE tem sido usada para produzir descendentes de espécies de equídeos ameaçadas como o cavalo *Przewalski* e zebras<sup>2</sup>.

Entre as suas indicações contam-se também:

- Produzir poldros de éguas impossibilitadas de levar a termo a gestação devido a problemas reprodutivos ou problemas músculo-esqueléticos.
- Diminuir o intervalo entre gerações na espécie (éguas de 2 anos incapazes de engravidar podem produzir embriões para éguas receptoras adultas).
- Realizar investigação sobre a fisiologia da relação materno-embrionária
- Realizar testes de descendência.

Além dos problemas ligados à superovulação e criopreservação de embriões e oócitos, a TE apresenta algumas limitações a ter em conta, sendo elas (McKinnon, acedido em 2011):

- Os custos, que se prendem sobretudo com a manutenção das receptoras.
- É necessária uma certa experiência por parte do operador.
- A recolha de embriões de éguas subfêrteis é baixa. Enquanto éguas normais dão uma taxa de recuperação embrionária de cerca de 70%, éguas idosas subfêrteis apresentam valores na ordem dos 20%.

---

<sup>2</sup> McKinnon & Squires 2007 de Summers PM, Shephard AM, Hodges JK et al: Successful transfer of the embryo of Przewalski's horse (*Equus przewalskii*) and Grant's zebra (*Equus burchelli*) to domestic mares (*Equus caballus*). J Reprod Fertil 1987; 80:13-20.

Os riscos associados a esta técnica são semelhantes aos dos programas de inseminação (IA) artificial, nomeadamente aqueles relacionados com palpações transrectais, a própria IA e lavagens uterinas (Coutinho da Silva, 2008).

Éguas com problemas que impeçam a concepção ou a manutenção precoce de um embrião como a endometrite pós cobrição persistente, lacerações cervicais irreparáveis e cicatrizes uterinas ou do oviducto devido a distócia, não são boas candidatas à TE (Hinrichs & Choi, 2005).

### **3. Fundamentos da recolha e transferência não cirúrgica de embriões**

#### **3.1 Embrião equino**

O embrião equino é concebido na ampola, perto da junção com o istmus. Aqui permanece até ao início da descida do oviducto, aproximadamente 4 dias após a ovulação, e culmina com a entrada no útero entre os 5,5 e 6,5 dias após a ovulação. Durante o estadio de desenvolvimento no oviducto, o embrião não aumenta de dimensão sendo esta semelhante ao oócito não fertilizado com um diâmetro entre os 149 e 178µm (Battut & Bruyas, 1997). No estadio uterino, o embrião começa uma fase de crescimento rápido no qual o diâmetro de vesícula aumenta gradualmente, mantendo a sua forma esférica até 17-18 dias pós-ovulação. Neste momento, atinge um *plateau* de crescimento e os seus contornos externos tornam-se irregulares ao mesmo tempo que se aproxima das pregas endometriais.

A monitorização do diâmetro do embrião pode ser realizada diariamente sem grandes dificuldades através da ecografia transrectal. A dimensão mínima identificável da vesícula embrionária é variável consoante a resolução da sonda bem como a experiência do operador sendo que, na maioria dos casos, uma vesícula de 3-4 mm é identificada (Cuervo-Arango & Newcombe, 2009).

#### **3.2 Recolha do embrião**

A recolha do embrião é normalmente realizada no dia 6, 7 ou 8 (dia 0 é o dia da ovulação) a partir de ovulações únicas e ocasionalmente de ovulações múltiplas (Squires et al, 2003). A média de recuperação de embriões de uma ovulação única num programa comercial de transferência de embriões é de aproximadamente 50%. No entanto, aquando de ovulações espontâneas duplas ou triplas, a taxa de recuperação embrionária é superior (Squires & McClain, 1987), sendo que certas raças, como os Puro-sangue Inglês, são mais propensos a terem ovulações múltiplas quando comparados com outras raças como os Árabes. Os embriões são colhidos um dia mais tarde se a égua for coberta com sémen congelado

(McKinnon, 2007), se for uma égua idosa pois o tempo que demora a percorrer o oviducto é maior e a taxa de crescimento do embrião menor (Losinno, 2010), ou se for inseminada após a ovulação. Cuervo-Arango et al (2009) refere que o único factor que verdadeiramente influencia o tamanho da vesícula embrionária parece ser a presença de espermatozóides no oviducto no momento da ovulação, pelo que embriões resultantes de inseminações pós-ovulação necessitam de aproximadamente um dia a mais para atingir dimensões semelhantes a embriões cuja inseminação foi realizada pré-ovulação.

As taxas de recolha de embriões dia no 7, 8 ou 9 pós-ovulação são muito semelhantes (Fleury & Alvarenga, 1999) sendo contudo ligeiramente menores para embriões D6 (Juliano & Squires, 1985). Esta menor recolha pode ser atribuída à ausência de identificação do embrião no meio de lavagem, à perda do embrião durante os procedimentos de recolha devido à sua pequena dimensão, à dificuldade em obter o embrião no líquido de lavagem devido à sua grande gravidade específica ou falha de alguns embriões em entrarem no útero no D6, sendo as duas últimas razões apontadas como as mais prováveis (McKinnon et al, 2007). Os embriões D6 são menores, mais duros e representam a melhor opção para micromanipulações como bissecção (Braun, 1994) e congelamento (Squires et al, 2003). Os embriões D8 são os de maiores dimensões e que podem ser ainda facilmente colocados numa pipeta de 0.25 ml para transferência. Em relação às taxas de gestação, os embriões mais velhos (maiores que D8) parecem ser menos viáveis à transferência não cirúrgica (Juliano et al, 1985) devido ao seu grande *ratio* volume/superfície.

A recolha de embrião por si só é um procedimento relativamente simples uma vez que o cérvix da égua em diestro é passível de ser distendido para permitir a introdução de um catéter. (Allen, 2005).

A égua dadora é colocada num tronco de contenção. A cauda é ligada ou simplesmente colocada no interior de uma luva de palpação e é levantada para evitar a conspurcação da zona que irá ser limpa. Procede-se então ao esvaziamento das fezes através do recto para minimizar a evacuação das mesmas durante o procedimento. De seguida toda a zona perineal é lavada utilizando-se um sabão neutro e por fim uma solução iodada. Sucessivamente, um catéter semi-rígido tipo *Foley*, de cerca de 80cm de comprimento com um balão insuflável de 30-60 ml (Losinno, 2010) é colocado na vagina e é passada através do cérvix, aproximadamente 5cm dentro do corpo uterino (McKinnon et al, 2007). Uma vez em posição, o balão é insuflado com ar ou com uma solução salina estéril e é puxado em direcção ao os interno da cérvix, selando, assim, o lúmen uterino. De seguida, são introduzidos por gravidade 1-2 L de meio que pode ser PBS (tampão fosfato salino) suplementado com uma fonte proteica como soro fetal bovino ou albumina de soro bovino que previne o embrião de aderir

ao silicone ou ao plástico usado no sistema de lavagem (Stout, 2006) ou Lactato de Ringer (Losinno, 2009). Depois de preenchido pela solução de lavagem, o útero pode ser massajado através do recto de modo a garantir que todo o lúmen seja lavado, bem como auxiliar na passagem do embrião das pregas endometriais para o meio de lavagem. Este depois é recuperado por gravidade num filtro de 75 $\mu$  (McKinnon et al, 2007). Existem diversos tipos de sistemas de lavagens, sendo o mais utilizado o sistema fechado com um "Y" central que garante uma via de passagem do meio para o útero e outra via do útero para o filtro. Quando combinada, a massagem *per rectum* e a elevação do útero proporcionam um fluxo contínuo de líquido de lavagem que auxilia na recuperação embrionária (Stout, 2006). O procedimento é repetido pelo menos três a seis vezes. Um estudo com o objectivo de melhorar a recolha embrionária demonstrou que, 31,6% dos embriões são recuperados nos primeiros 3L de solução (Hudson & McCue, 2004). Foi sugerido que a taxa de recolha embrionária aumenta se a solução de lavagem for deixada por algum tempo (cerca de 3 minutos) no útero entre as lavagens pois pensa-se que durante este tempo o embrião, devido à sua mobilidade, possa passar para a solução sendo, assim, recolhido (Hinrichs, 1990). Também a administração de ocitocina antes do início da recolha poderá aumentar a taxa de recuperação embrionária pois estimula as contracções uterinas (McCue, Niswender & Macon, 2003).

### **3.3 Identificação e avaliação do embrião**

A cada sequência de lavagem, o filtro é examinado para se verificar a presença do embrião. Se o embrião não for visível após a terceira lavagem, o conteúdo do filtro é transferido para uma placa de *Petri*. Assim, a procura pelo embrião prossegue com o auxílio de uma lupa com ampliação de 10x-50x que é quase sempre necessária para embriões D7 ou mais novos (D6 têm uma dimensão de cerca 150  $\mu$ m). Embriões D8 podem ser visíveis a olho nu pois apresentam um diâmetro médio de 0.5-1mm (Stout, 2006). A lupa é, ainda, importante para a classificação da qualidade e estadió de desenvolvimento do embrião.

Aquando de uma falha na fertilização, o óócito não fertilizado é normalmente retido no oviducto (Flood, Jong, Betteridge, 1979) não podendo, deste modo, ser recuperado. Assim, caso um óócito não fertilizado seja encontrado, assume-se que provenha de um ciclo antigo e que acompanhou o embrião na sua passagem para o útero. Estes óócitos distinguem-se dos embriões pela sua aparência achatada, acelular e granular (Stout, 2006). É importante ter-se em conta que, caso apenas o óócito seja encontrado, tanto o filtro como a placa devem ser observados atentamente para localizar o embrião.

Depois de encontrado, o embrião é transferido para uma nova placa contendo dez gotas separadas de PBS com 10% de soro fetal bovino. Os embriões são lavados pelo menos três

vezes em cada gota (Fleury et al, 1999). As lavagens são importantes pois ajudam a diluir qualquer microrganismo introduzido durante a recolha ou já presente no útero da égua.

### 3.4 Transferência do embrião

Até há relativamente pouco tempo, a transferência de embriões equinos era realizada cirurgicamente através de uma laparotomia com incisão na linha média ventral, sob anestesia geral (Imel, Squires, Elsdén & Shideler, 1981) ou através do flanco, usando anestesia local e sedação da égua (Squires, Garcia & Ginther, 1985). Actualmente restringe-se a utilização de técnicas cirúrgicas a outras técnicas de reprodução assistida, nomeadamente transferência de oócitos (OT), injeção intracitoplasmática de sêmen (ICSI) e transferência de gâmetas intrafalopiana (GIFT). A transferência não cirúrgica apresenta algumas vantagens em relação à cirúrgica pois é mais rápida, mais barata e melhor para o bem-estar das receptoras (Stout, 2006) além de que, operadores experientes podem conseguir taxas de gestação acima dos 80% quando receptoras em condições adequadas estão disponíveis (Jasko, 2002).

Os embriões equinos podem ser transferidos para o útero da égua receptora no meio de cultura nos quais foram recuperados. No entanto, é mais comum transferir o embrião num outro meio, depois de efectuadas as referidas lavagens (Stout, 2006).

A transferência transcervical do embrião é normalmente efectuada com o auxílio de uma pipeta de transferência do tipo *Cassou* (IMV, L'Aigle, France), depois de se colocar o embrião numa palhinha de 0.25 ou 0.5 ml. A escolha do tamanho da palhinha e o tipo de pipeta vai depender da preferência do operador bem como do tamanho do embrião. Os embriões de dimensões reduzidas são mais facilmente colocados em palhinhas de 0.25 ml enquanto que embriões de maiores dimensões podem não caber na palhinha ou não passar pela sua abertura (Jasko, 2002).

**Figura 15:** Embrião equino e ponta do catéter de transferência à lupa.



Imagem gentilmente cedida pela Dra. Maria Augusta Alonso

Como alternativa, os embriões equinos (particularmente os de grande dimensão) podem ser transferidos utilizando uma pipeta de inseminação estéril (Wilsher & Allen, 2004). Em ambos os casos, a palhinha é carregada com três colunas de meio, separada por colunas de ar sendo o embrião colocado na segunda coluna de meio. A primeira coluna de meio serve para lubrificar a extremidade da pipeta, enquanto que a terceira garante que o embrião possa ser empurrado para fora da mesma (Stout, 2006).

**Figura 16:** Palhinha carregada.



Antes da transferência do embrião, é administrada acepromazina (0.04 mg/Kg, IV) à égua receptora de modo a tranquilizá-la bem como para obter relaxamento vulvar (Fleury & Alvarenga, 1999). A cauda da égua é amarrada, o conteúdo fecal é removido e a sua genitália externa é limpa, à semelhança do procedimento utilizado com a égua dadora.

A técnica exacta utilizada para manipular o catéter de transferência através do cérvix até ao útero difere entre os operadores. No entanto, o essencial é assegurar que a pipeta entre no útero sem agentes contaminantes da vagina ou da vulva e com o mínimo traumatismo através do canal cervical e do endométrio. A contaminação pode ser minimizada colocando o catéter de transferência numa bainha de plástico ("camisa sanitária") que é então introduzida no os externo do cérvix. Uma vez no cérvix, a bainha é puxada cuidadosamente mas firmemente enquanto o catéter é mantido no lugar de modo que apenas a pipeta seja introduzida na porção cranial do cérvix e no lúmen uterino (Stout, 2006). A dificuldade da técnica consiste em romper a camisa no momento certo bem como na habilidade de manobrar a pipeta através de um canal cervical contraído sem excessiva dilatação ou traumatismo. Esta manipulação pode ser facilitada colocando o cérvix firmemente entre dois dedos, puxando-o para trás de modo a que se endireite (Stout, 2006). Allen e Wilsher, propuseram em 2004, utilizar um espéculo bico de pato para visualizar e uma pinça dente de rato para agarrar e endireitar o cérvix. Esta

operação teria os mesmos efeitos da acima descrita requerendo menos manualidade, apesar de necessitar de mais operadores. Outra alternativa válida é realizar uma palpação transrectal de modo a direccionar o catéter de transferência para o corno uterino. Apesar de muitas vezes este procedimento ser desnecessário, pode ser útil se existirem dúvidas se a pipeta passou através do os cervical interno para o lúmen uterino.

Sabe-se que o traumatismo e/ou estímulos mecânicos do tracto genital podem activar a cascata do ácido araquidónico, resultando na síntese e libertação de vários mediadores da inflamação nomeadamente da prostaglandina ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) e substâncias relacionadas (Higgins & Lees, 1984). A  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , além de ser uma hormona luteínica pois provoca a lise do corpo lúteo, funciona como um marcador biológico dos processos inflamatórios uma vez que é um mediador endógeno que se forma como consequência da oxidação do ácido araquidónico. Assim, é legítimo questionar se a manipulação do tracto genital aquando da transferência não-cirúrgica de embriões, poderá causar a libertação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  em quantidades tais a influenciar a duração do ciclo éstrico da égua. Um estudo realizado em 1997 (Kask, Odensvik & Kindahl) verificou que as éguas respondiam à manipulação do tracto genital com libertação de prostaglandina mas a luteólise não era induzida, apesar das elevadas quantidades de metabolitos de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . No entanto, a possibilidade de que a libertação da hormona possa afectar o embrião e o seu ambiente, não pode ser ignorada.

### **3.5 Refrigeração e transporte**

Uma das maiores mudanças na transferência de embriões equinos nos últimos anos foi a capacidade de armazenar embriões a 5°C (Squires et al, 2003). A refrigeração e o armazenamento de embriões a esta temperatura permitiu expedir os embriões para centros especializados para transferência em éguas receptoras. Muitos criadores e profissionais não têm a possibilidade ou não querem possuir e manter éguas receptoras. Deste modo, pelo menos nos EUA, existem vários centros com éguas receptoras que trabalham com embriões transportados provenientes de outros locais (Squires et al, 2003).

O primeiro relato de que os embriões equinos podiam ser armazenados a 4-5°C por um determinado período com uma perda mínima da sua viabilidade data do final dos anos 80 (Carnevale, Squires & McKinnon, 1987). Neste estudo foi demonstrado que o meio *Ham's F-10*, previamente gaseificado com uma mistura de 5%  $\text{CO}_2$ , 5% de  $\text{O}_2$  e 90% de  $\text{N}_2$ , era capaz de manter a viabilidade do embrião por 24 h. Carney et al (1991) relataram não existir diferenças significativas nas taxas de gestação entre embriões refrigerados e transferidos e embriões transferidos imediatamente após a recolha. Os embriões podem ser transportados utilizando dispositivos de refrigeração passivos (Equitainer, Hamilton Thorne Biosciences,



Beverly, MA) a 5°C sobretudo por meios terrestres (carro, mota) e aéreos. O intervalo entre a recolha e a transferência dos embriões é geralmente de 12-30 h. No entanto, se um embrião não for recolhido da égua dadora escolhida, o meio *Ham's F-10* que foi previamente gaseificado, não pode ser reutilizado (Squires et al, 2003). Assim, diversos investigadores tentaram identificar um meio de cultura diferente para transportar embriões equinos que não necessitasse de ser gaseificado. McCue et al (2000) compararam as taxas de gestação de embriões refrigerados a 24 h em *Ham's F-10* e em *EmCare®*, solução de suporte para embrião. As taxas de gestação não diferiram entre os dois meios. Seguidamente, Moussa et al em 2004, relataram que, enquanto o armazenamento refrigerado de um embrião D7 por 24 h conduzia a um aumento da percentagem de células mortas (de 0 a 1.4%), não existiam diferenças significativas na capacidade dos meios *Ham's F-10*, *EmCare®* e *ViGro Holding Plus* de prevenir a morte de células embrionárias. Assim, estes autores concluíram que tanto os meios *EmCare®* como o *Vigro Holding Plus* são uma alternativa viável ao *Ham's F-10* para o armazenamento refrigerado dos embriões equinos durante 24 h. No entanto são necessários mais estudos num maior número de embriões para afirmar que estes meios possam ser recomendados sobre o *Ham's F-10*.

#### **4. Factores que influenciam o sucesso de um programa de transferência de embriões**

Para maximizar o sucesso de um programa de transferência de embriões é necessário identificar os factores que afectam a taxa de recolha embrionária bem como os factores que afectam a taxa de gestação (Coutinho da Silva, 2008). Alguns destes factores foram já mencionados ao longo do texto, outros serão agora desenvolvidos.

##### **4.1 Factores que influenciam a recolha**

Entre os factores que afectam a recolha embrionária incluem-se o dia da recolha, o número de ovulações, a idade da égua dadora e a qualidade do sémen (Carnevale et al, 2000). O dia da recolha e o número de ovulações foi já anteriormente referido. De um modo geral, embriões recuperados no D6 apresentam taxas de recolha inferior àquelas do dia 7 ao dia 9 (Iuliano & Squires, 1985; Fleury & Alvarenga, 1999). A única vantagem em recolher embriões do D6 consiste na sua menor dimensão pelo que são mais viáveis após congelamento. As ovulações duplas ou triplas durante o mesmo ciclo resultam em maiores taxas de recuperação embrionária que as de ovulações simples (Squires e McClain, 1987).

Quando a AI é utilizada, a fertilidade do ganhão e consequentemente a recuperação embrionária é influenciada pela dose de sémen, pela qualidade e pelo método de preservação (Stout, 2006). No caso de éguas jovens e férteis inseminadas com sémen de ganhões férteis,

mais de 70% das lavagens resultam em recolha de embriões. No entanto, esta taxa cai substancialmente quando são utilizadas como dadoras éguas idosas (mais de 14 anos) ou com uma história de subfertilidade<sup>3</sup> ou ainda quando é usado sémen refrigerado ou sémen congelado. Em cavalos de desporto na Europa e EUA, a taxa de recuperação embrionária varia em torno dos 30 a 50% pois os proprietários muitas vezes desejam obter embriões de éguas idosas inseminadas com sémen refrigerado ou congelado (Squires et al, 2003).

No entanto, o factor com maior impacto na recuperação embrionária é a égua e o seu estado reprodutivo (Squires et al, 1999). Entre as causas da reduzida recolha embrionária incluem-se as patologias do oviducto e uterinas e o aumento da morte embrionária precoce (Ball, Little, Weber & Wodds, 1989).

Para que a TE seja bem sucedida, o tracto genital da égua dadora necessita de apresentar determinadas condições, nomeadamente (Coutinho da Silva, 2008):

- Ovários com crescimento de folículos e ovulação de um oócito saudável;
- Oviductos com capacidade de transportar gâmetas, suportar a fertilização e transportar o embrião até ao útero;
- Útero que promova um ambiente adequado para o embrião até à sua recolha e um cérvix competente e funcional até à fase inicial da gestação.

#### 4.1.1 Endometrite

Desde há muitos anos que se sabe que a acumulação de líquido no útero é associado a uma redução da fertilidade (Pycock, 2007). Esta subfertilidade é resultado de um ambiente uterino inadequado para o desenvolvimento do embrião. Em certos casos, a endometrite persiste e causa regressão precoce do corpo lúteo. Entende-se por endometrite um processo inflamatório agudo ou crónico envolvendo o endométrio, consequente a causas infecciosas ou não infecciosas.

A endometrite persistente pós-cobrição é a maior causa de infertilidade nas éguas, sendo a resposta inflamatória induzida pelo sémen mais importante que a endometrite infecciosa (Troedson, Loset & Alghamdi, 2001).

A endometrite pós-cobrição não deve ser vista como uma patologia mas sim como uma reacção fisiológica de limpeza ao excesso de esperma, de plasma seminal e de resíduos inflamatórios do útero antes da entrada do embrião no lúmen uterino. No entanto, se a endometrite persistir além do 3º ou 4º dia da fase lútea, não só é incompatível com a sobrevivência do embrião como também se verifica uma libertação de PGF<sub>2α</sub> resultando em

---

<sup>3</sup> Stout, 2006 de Meadows, S, Lisa, H & Welsh, C (2000) Factors affecting embryos recovery, embryo development and pregnancy rate in a commercial embryo transfer program. In: Proceedings of the 1st European equine gamete group, Havemeyer Foundation monograph series 1, Eds: W.R. Allen & J. F. Wady, R&W Publication, N Newmarket.pp 61-62

luteólise com uma rápida redução dos níveis de progesterona e retorno precoce ao estro (Pycock, 2007).

No caso de éguas idosas que já tiveram vários descendentes, o útero pode estar descaído ventralmente no abdómen, resultando num atraso da limpeza uterina. É vital existir uma abertura cervical adequada que permita a drenagem e, qualquer falha na dilatação do cérvix, pode levar à acumulação de líquido. Éguas que tiveram uma carreira desportista importante muitas vezes só são cobertas quando já não estão em competição, quando já atingiram uma certa idade. Muitas vezes tais éguas apresentam a "síndrome da égua idosa virgem" que resulta da referida falha na dilatação do cérvix e acumulação de líquido. Éguas idosas apresentam, muitas vezes, endometrose, isto é, fibrose do estroma e alterações degenerativas glandulares diagnosticadas ao exame de uma biopsia do endométrio (Pycock, 2007).

#### 4.1.2 Morte embrionária

A morte embrionária é definida como a perda do embrião até aos 40 dias de gestação que corresponde ao período de passagem do estadio de embrião ao de feto (Vanderwall & Newcombe, 2007).

A recuperação embrionária entre os dias 6 e 9 é marcadamente inferior em éguas idosas quando comparada com éguas jovens, o que implica uma maior taxa de perda embrionária precoce durante a primeira semana de gestação. Tem sido referido que a perda embrionária precoce entre a fertilização e o D14 é 10% menor em éguas jovens quando comparada com éguas idosas (Ball et al, 1989).

Os factores que contribuem para a ocorrência de morte embrionária precoce podem ser classificados como intrínsecos, extrínsecos e embrionários (Ball, 1988). Os factores intrínsecos incluem doença endometrial, deficiência em progesterona, idade materna, lactação, cio do poldro e momento da inseminação relativa à ovulação. Os factores extrínsecos incluem stress, nutrição, clima, palpação transrectal/ecografia e manipulação para reprodução assistida. Os factores embrionários incluem anomalias cromossomais ou características inerentes ao embrião. Independentemente da causa existem alguns elementos que indicam a eminência de perda embrionária entre eles um formato irregular da vesícula embrionária, uma mobilidade prolongada da vesícula, vesícula de dimensões inferiores ao esperado, uma perda de batimento cardíaco, falha no desenvolvimento embrionário, deslocamento da vesícula com perda de fluidos e edema das pregas endometriais.

#### 4.1.2.1 Factores Intrínsecos

- Endometrite- a endometrite pode ser classificada como infecciosa (endometrite aguda ou crónica, já referida) e não infecciosa (fibrose periglandular e quistos endometriais). A fibrose periglandular é a condição patológica mais frequente em éguas idosas mas que não parece influenciar directamente o aumento de incidência da perda embrionária precoce (Ball, Hillman & woods, 1987). A incidência de quistos endometriais aumenta com a idade (Kaspar, Kähn, Laging & Leidl, 1987), sendo um factor confuso quando se pretende avaliar o efeito de um quisto na fertilidade pois é difícil diferenciar se um efeito resulta da presença do quisto ou da idade da égua. Existem dois mecanismos plausíveis que explicam porquê os quistos podem interferir negativamente com a fertilidade. Por um lado quistos grandes (maiores que 3 cm) podem interpor-se à mobilidade do embrião no útero conduzindo a uma falha no reconhecimento materno (o embrião ao movimentar-se bloqueia a secreção de PGF com consequente manutenção do corpo lúteo). Por outro lado caso um embrião se fixe num local em contacto directo com um quisto, pode receber uma quantidade inadequada de nutrientes (Holyoak, Ley, 2007).
- Idade materna- Ball et al (1989) conduziram um estudo em que verificaram que a taxa de sobrevivência de embriões D4 oriundos de éguas jovens era significativamente superior ao de éguas idosas (84% *versus* 25% respectivamente). Os defeitos dos embriões de éguas idosas podem ser inerentes ao próprio embrião ou podem resultar da influência do ambiente do oviducto antes do D4. Em relação aos oócitos, geralmente os de éguas dadoras jovens (de 3 a 13 anos) são mais viáveis que os oócitos de éguas idosas (Carnevale, 2007). Quando os oócitos são recolhidos de folículos pré-ovulatórios de dadoras jovens (6 a 10 anos) e de dadoras idosas (20 a 26 anos) e transferidos para oviductos de receptoras jovens (3 a 7 anos), significativamente mais oócitos de éguas jovens comparado com éguas idosas desenvolvem-se em vesículas embrionárias (92% *versus* 31%). Os oócitos provenientes de éguas idosas apresentam mais anomalias morfológicas, como vesículas largas e formas irregulares, aquando da visualização pelo microscópio electrónico (Carnevale et al, 1999).

#### 4.2 Factores que influenciam a taxa de gestação após a transferência

Os principais componentes de uma TE incluem as receptoras, os embriões e a técnica de transferência. As taxas de gestação após transferência são influenciadas pela variabilidade entre estes componentes, nomeadamente o método de transferência, os técnicos, a dimensão e idade do embrião, a morfologia do embrião, a estação do ano, a sincronia entre dadora e

receptora, os procedimentos de cultura e armazenamento dos embriões e a idade e história reprodutiva das dadoras (Carnevale et al, 2000).

#### 4.2.1 Embrião

Um embrião de qualidade reduzida, verificada com o auxílio da lupa, afecta não só a probabilidade de estabelecimento de uma gestação na égua receptora (McKinnon & Squires, 1988) como também a incidência de perda da gestação (Carnevale et al, 2000). Felizmente, a maioria dos embriões recuperados apresentam uma boa qualidade morfológica (mais de 90% são de grau 1 ou 2: McKinnon & Squires, 1988), pois embriões que degeneram em estádios iniciais do seu desenvolvimento não conseguem completar o seu trânsito no oviducto. Carnevale et al (2000) verificaram que embriões de grau 3 e 4 resultavam em taxas de gestação significativamente mais baixas que os de grau 1 ou 2 (40% versus 68%, respectivamente). Gestações resultantes de embriões de grau 2 ou superior originam maiores perdas embrionárias no D50 (26% de perda embrionária precoce versus 12% de embriões grau 1). Os mesmos autores verificaram que mórulas ou blastocistos muito pequenos recolhidos no D7 ou D8 têm menor probabilidade de resultar numa gestação viável, enfatizando que o atraso no desenvolvimento pode ser um sinal de baixa qualidade embrionária (Squires et al, 1999).

**Tabela 3:** Sistema de classificação de embriões equinos.

Grau 1	Excelente: Embrião ideal esférico com blastómeros de tamanho, cor e textura uniformes
Grau 2	Bom: Com alguns blastómeros extrusados, ou formato irregular
Grau 3	Razoável: Problemas bem definidos mas não severos, como blastómeros extrusados, células degeneradas ou blastocele colapsado
Grau 4	Inferior/Mau: Problemas severos, blastocele colapsado, inúmeros blastómeros extrusados e muitas células degeneradas
Grau 5	Morto ou não fertilizado: Totalmente degenerados, com ruptura ou não fecundados.

Adaptado de Squires & Seidel, 1995

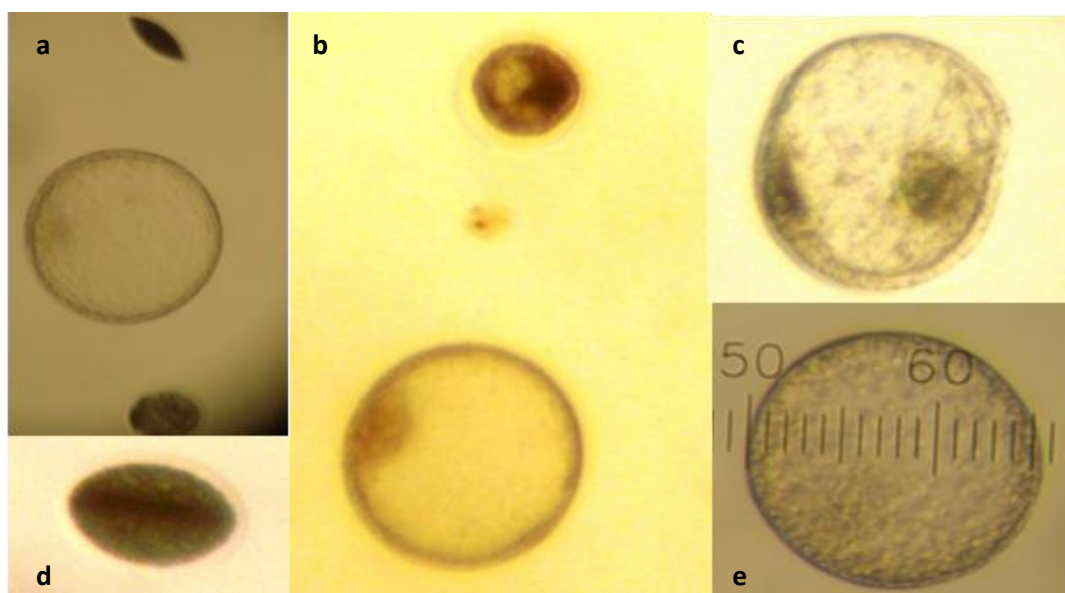
De facto, existe pouca coisa que se possa fazer para remediar a má qualidade embrionária além de se tentar evitar as predisposições que reduzem a qualidade embrionária; estas predisposições incluem a endometrite pós-cobrição (Squires & Seidel, 1995) e a idade

materna avançada (Ball et al, 1989). Não é surpreendente que dadoras idosas não só influenciem na recolha embrionária como também reduzam a probabilidade de estabelecimento de uma gestação após transferência, com aumento da perda embrionária precoce.

A avaliação com o auxílio da lupa apenas mostra algumas anomalias morfológicas do embrião, sendo necessárias técnicas mais complexas e mais demoradas para analisar certos aspectos da qualidade embrionária. Porém, um maior conhecimento da qualidade do embrião, nomeadamente o número de células mortas (Moussa et al, 2004), não modifica a decisão de transferir ou não um embrião; quanto muito permite dar ao proprietário um prognóstico mais aproximado da realidade no estabelecimento de uma gestação.

Em relação à origem do embrião (refrigerado *versus* fresco), como anteriormente referido, diversos estudos concluíram não existirem diferenças significativas na taxa de gestação entre embriões refrigerados e embriões imediatamente transferidos (Carney et al, 1991, Carnevale et al 1987, Carnevale et al, 2000).

**Figura 17:** Estádios de desenvolvimento e classificação do embrião equino



Fotografias gentilmente cedidas pela Dr<sup>a</sup>. Maria Augusta Alonso.

**Legenda:**

**a)** Oócito não fertilizado, Blastocisto expandido grau 1 e Blastocisto inicial grau 2. **b)** Blastocisto inicial grau 3 e Blastocisto expandido, grau 1. **c)** Blastocisto expandido grau 2. **d)** Oócito não fertilizado. **e)** Blastocisto

#### 4.2.2 Técnica de transferência

O simples facto da TE transcervical ser mais sensível à capacidade técnica do operador do que a transferência cirúrgica (Allen, 2005) demonstra que a técnica é um importante determinante do sucesso. Em geral presume-se que as duas causas mais importantes na falha da gestação após a transferência transcervical sejam a contaminação bacteriana de um útero dominado pela progesterona e/ ou alterações hormonais desencadeados pela dilatação excessiva ou manipulação do cérvix (Handler, Königshofer, Kindahl, Schams & Aurich, 2003). Dado a este facto, muitos operadores administram por rotina antibióticos por via sistémica e/ou meglumato de flunixinina, antes e após a transferência, para reduzir a probabilidade de contaminação bacteriana imediatamente antes da transferência bem como progesterona durante as 2-3 semanas após transferência para reduzir o risco de perda embrionária (Stout, 2006). No entanto, as elevadas taxas de gestação conseguidas por operadores experientes (Jasko, 2002) na ausência de quaisquer medidas de suporte sugere que tais tratamentos podem ser desnecessários. É possível que a falha no estabelecimento de gestação no caso de operadores inexperientes seja resultado da não colocação do embrião na cavidade uterina, seja porque o catéter de transferência não foi suficientemente introduzido no os cervical interno, seja porque o embrião ficou aderente à ponta da catéter de transferência (Jasko, 2002).

#### 4.2.3 Sincronia receptora-dadora

O factor mais importante que afecta a probabilidade do estabelecimento de uma gestação após a TE é a sincronia entre a égua dadora e a receptora (Stout, 2006). Apesar da enorme variedade da duração do ciclo éstrico das éguas dificultar os procedimentos de sincronização, o facto da sincronização requerida para a égua ser menos precisa que em outras espécies animais funciona como um factor compensatório (Allen, 2005). As receptoras que ovularam um dia antes (+1) e 3 dias depois (-3) da dadora apresentaram grande probabilidade de levar a termo a gestação; fora deste intervalo, as taxas de gestação caíam substancialmente (Squires & Siedel, 1995).

Depois de 1996, outras investigações foram feitas de modo a aumentar este intervalo. Carnevale et al em 2000 transferiram embriões para receptoras D5 a D9 pós-ovulação, verificando que as perdas de gestação eram significativamente menores em receptoras D5 ou D6 pós-ovulação quando comparadas com receptoras D7 a D9 pós-ovulação. As taxas de perdas embrionárias em D8 (15,1%) eram aproximadamente o dobro das taxas de receptoras D5 e D6 (7,3 e 8,6%). Os resultados sugerem que as receptoras utilizadas no início do seu ciclo são menos susceptíveis à perda embrionária. O reconhecimento precoce da gestação na égua pode afectar a produção de progesterona pelo corpo lúteo (CL) e a qualidade do

ambiente uterino. Assim, o reconhecimento da gestação pode não ser fiável em receptoras D9. Caso uma receptora D9 tenha de ser usada, a suplementação com progesterona no momento da transferência é indicada. Os presentes resultados indicam que o tempo após a ovulação é mais importante que a sincronização entre receptora e dadora, aquando da escolha de uma receptora (Carnevale et al, 2000).

Wilsher et al (2006) administraram ácido meclofenâmico (um inibidor sintético da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) a éguas receptoras no D9 pós-ovulação, que tinham ovulado um dia antes da dadora, ou seja, de embriões D8. Elevadas taxas de gestação foram alcançadas em receptoras que ovularam 2 a 3 dias antes da dadora, apesar de não estar claramente identificado o mecanismo pelo qual o ácido agiu. Gestações estabelecidas com assincronias mais extremas entre éguas dadoras e receptoras (+4 ou 5 dias) resultavam quase invariavelmente em perda de gestação. Apesar da razão de tal perda ser desconhecida, esta dever-se-á ao facto do embrião não ter tido tempo de interagir com o útero para que este produzisse nutrientes (Carnevale et al, 2000) ou dar-se o reconhecimento materno da gestação pela prevenção da regulação dos receptores de ocitocina, processo que se inicia entre o D8 e o D10 pós-ovulação (Stout, Lamming & Allen, 1999). Em geral, a maioria dos operadores prefere transferir embriões D7 ou D8 em receptoras que ovularam 0-2 dias depois da dadora.

Existem vários métodos utilizados na sincronização do estro na égua que variam consoante o operador. No entanto todos estes métodos assentam em quatro pilares: conclusão da fase lútea, aumento da fase lútea, indução da ovulação e inibição da fase folicular. Os agentes farmacológicos mais usados para conseguir-se a sincronização são as prostaglandinas, os progestagénios, a gonadotrofina coriónica humana (hCG), a deslorelina e o estradiol-17 $\beta$ . Os programas de sincronização mais fiáveis e com maiores resultados são os que utilizam uma combinação destes métodos com os agentes farmacológicos (Bradecamp, 2007)

A prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) é utilizada para terminar a fase lútea, permitindo o retorno ao estro, ao causar a lise do corpo lúteo (CL). O CL equino exhibe sensibilidade incompleta ao  $\text{PGF}_{2\alpha}$  até aproximadamente 5 dias após ovulação. Em média, as éguas retornam ao estro 5 a 7 dias após a administração da prostaglandina na presença de um CL maduro e a ovulação ocorre 9 a 11 dias após a administração. No entanto, dado que a fase folicular desempenha um importante papel no controlo da duração total do ciclo estrico da égua, o tempo entre a administração da prostaglandina e a ovulação pode ser muito variável dependendo do tamanho e tipo de folículo presente no momento da administração (Bradecamp, 2007).

Os progestagénios são tradicionalmente utilizados nos programas de sincronização do estro para aumentar a duração da fase lútea. As duas formas mais utilizadas são a progesterona em gel e o altrenogest. A progesterona tem um efeito inibidor na libertação da hormona



luteinizante (LH) pela hipófise anterior. Logo, se administrada por um certo período de tempo (15 a 18 dias), o CL vai regredir sendo a administração exógena a única a suprimir o estro.

Para melhorar a sincronização do estro, utiliza-se frequentemente a combinação da progesterona com o estrogénio. O efeito combinado das duas hormonas provoca um feedback negativo mais profundo na libertação da gonadotrofina do que a progesterona sozinha, o que resulta numa inibição mais uniforme do desenvolvimento folicular.

A indução da ovulação é também uma parte importante num programa de sincronização do estro. Os dois agentes farmacológicos mais usados para induzir a ovulação são a hCG e a deslorelina. A hCG é uma proteína constituída por duas cadeias de péptidos que, embora quimicamente diferente, têm uma actividade semelhante à hormona luteinizante (LH). A deslorelina é um análogo sintético da hormona libertadora da gonadotrofina (GnRH).

A administração de hCG quando um folículo de 35 mm de diâmetro ou maior está presente numa égua em estro, resulta numa ovulação nas 36 +/- 4 horas seguintes. A administração de deslorelina nas mesmas circunstâncias origina uma ovulação em 41 +/- 3 horas (Bradecamp, 2007).

É necessário recordar que, mesmo que uma receptora esteja sincronizada com a dadora, esta pode não ser a ideal devido à presença de edema uterino ou fluido, tónus cervical fraco ou inadequada formação de CL pelo que é importante sincronizar pelo menos três receptoras para cada dadora para aumentar as probabilidades de se ter uma receptora ideal no momento da transferência (Bradecamp, 2007).

Uma abordagem alternativa descrita para garantir uma adequada sincronização hormonal da receptora é o uso de éguas ovariectomizadas ou em anestro sazonal tratadas com progesterona logo após a ovulação da dadora (Hinrichs, Sertich, Palmer & Kenney, 1987). Esta abordagem pode ser particularmente útil no início da estação quando relativamente poucas receptoras cíclicas estão disponíveis. Apesar do número de transferências descritas deste tipo ser baixa, a gestação e as perdas de gestação não parecem ser significativamente diferentes daquelas de éguas sincronizadas cíclicas (Carnevale et al, 2000), desde que doses adequadas de progesterona sejam administradas até que exista uma produção de progesterona endógena suficiente para a manutenção da gestação ou seja até aos 120 dias de gestação. (Mckinnon et al, 1988).

#### 4.2.4 Receptoras: outros aspectos importantes

Apesar da sincronização da ovulação ser um dos componentes mais importantes no manejo das receptoras, existem muitos outros factores que afectam a probabilidade de estabelecimento e manutenção de uma gestação.

As receptoras devem estar em boas condições de saúde e terem boa condição corporal e devem ser, ainda, relativamente jovens (de 3 a 12 anos) uma vez que a idade é um importante factor predisponente à alteração do endométrio (Stout, 2006). De facto, receptoras com idade superior a 10 anos parecem estar em maior risco de perder uma gestação de uma transferência (Carnevale et al, 2000). Uma receptora deve, também, exibir uma ciclicidade normal e não mostrar sinais óbvios de patologias no tracto reprodutor (como por exemplo, quistos endometriais, acumulação de fluido uterino, pneumovagina) (Stout, 2006).

Um factor importante para uma égua que se pretende utilizar como receptora numa TE é possuir um cérvix não danificado e não tortuoso. Falhas em passar o cérvix, entrar no lúmen uterino ou necessidade de assistência digital para passar a pipeta de transferência, são provavelmente as razões mais comuns na falha de estabelecimento de gestações no caso de operadores inexperientes ou quando apenas um pequeno número de receptoras está disponível (Stout, 2006). Outro factor útil na escolha de uma receptora aquando da transferência é o seu tónus cervical e uterino; um tónus fraco é associado a menores taxas de gestação e maiores riscos de perda embrionária (Carnevale et al, 2000). Assim, o sucesso de um programa de TE beneficia largamente da existência de várias receptoras para que se possa utilizar uma outra mais adequada no caso de, no momento da transferência, a receptora escolhida apresentar um útero flácido ou um cérvix difícil de se passar o catéter (Stout, 2006).

Outro factor a ter em conta aquando da escolha da receptora é a sua dimensão, aspecto que é muitas vezes ignorado em detrimento dos custos e da sincronia. No entanto, uma série de estudos (Allen, Wilsher, Tiplady & Butterfield, 2004) envolvendo a transferência de Puro-Sangue Inglês (PSI) para pôneis e vice-versa, demonstraram que incongruências entre o tamanho genético do embrião e a égua receptora podem afectar vários aspectos do desenvolvimento uterino e pós-natal. Uma dimensão materna inapropriada, conduz a um sobre ou sob crescimento do feto que, apesar do grau de compensação durante a vida pós natal, era mantido na maturidade. O atraso no crescimento intrauterino dos PSI gerados num ambiente desprovido do útero da pônei foi evidenciado por sinais de imaturidade física e comportamental à nascença como atraso no tempo de se levantar e de mamar e na capacidade reduzida de libertar cortisol em resposta à hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (Ousey et al, 2005). Em geral, parece que a utilização de uma receptora que difere marcadamente da

dimensão da dadora influencia o tamanho da cria e, em casos piores, aumenta a morbidade intrauterina no pós-natal e mesmo na idade adulta.

## **5. Limitações à técnica**

Um dos maiores custos num programa de transferência de embriões é a manutenção das receptoras. Se fosse possível superovular consistentemente éguas e obter múltiplos embriões, as gestações por transferência de embriões poderiam ser obtidas mais cedo e os embriões extras poderiam ser congelados (Alvarenga, McCue, Bruemmer, Neves Neto & Squires, 2001).

### **5.1 Superovulação**

Algumas das vantagens da superovulação incluem (McKinnon & Squires, 2007) a possibilidade em recolher múltiplos embriões, obter maiores taxas de gestação por cada tentativa de recolha, aumentar o número disponível de embriões para congelar e aumentar o número de folículos pré-ovulatórios. Alguns dos problemas associados à superovulação são a inconsistência do número de éguas que respondem aos tratamentos de superovulação, a falta de fármacos comerciais para a superovulação, o custo considerável destes programas e a possível baixa viabilidade dos múltiplos embriões.

Historicamente, a superovulação foi conseguida através da manipulação das ondas foliculares na égua (Squires, 2006). Uma onda folicular é um grupo de folículos que emerge sincronizadamente. As ondas são caracterizadas de "maior" ou "menor" na vaca e na égua; é caracterizada de "menor" se não existir uma divergência e diferenciação de um folículo dominante. Uma onda menor pode constituir o mecanismo inicial para o crescimento folicular na próxima onda. Durante uma onda folicular maior, os folículos divergem em dominantes e subordinados quando atingem dimensões aproximadas de 23 mm de diâmetro. O folículo dominante continua a crescer e a desenvolver-se, enquanto o crescimento dos folículos subordinados é inibido ou eventualmente regride (Jacob et al, 2004).

A manipulação das hormonas associadas ao desenvolvimento dos folículos dominantes e regressão dos subordinados está na base da superovulação (Meyers-Brown et al, 2010). O número de folículos que ovulam em resposta a tratamentos com hormonas exógenas é limitado nas éguas quando comparado com ovelhas e gado (McKinnon & Squires, 2007). Algumas tentativas para superovular éguas cíclicas usando preparados de gonadotrofina coriônica equina (eCG), GnRH, hormona folículo-estimulante porcina e a imunização contra a inibina pareceram ser ineficazes. No entanto, o extracto pituitário equino (EPE; indisponível comercialmente) e a hormona folículo-estimulante equina (eFSH; preparação de pituitária

semi-purificada) parecem ter mais sucesso na indução consistente de ovulações múltiplas na égua (Squires & McCue, 2007).

#### 5.1.1- Extracto pituitário equino (EPE)

O extracto pituitário (EPE) equino trata-se de um extracto pituitário não refinado obtido por extracção de pituitárias de matadouro, contendo 6% a 10% de LH e 2% a 4% de FSH <sup>4</sup>. Foi demonstrado (Woods & Ginther, 1984) que ovulações múltiplas podem ser induzidas seja em éguas cíclicas seja em éguas em anestro sazonal pelo EPE. No entanto, a indução da ovulação em éguas em anestro sazonal é impraticável pois um grande número dessas éguas continua a não ciclar depois da indução da ovulação e, se emprenham, não conseguem manter o corpo lúteo. Além disso, as doses efectivas de EPE para indução da ovulação em éguas em anestro são superiores. Rosas et al (1998) realizaram um estudo onde comparavam a hormona folículo-estimulante equina, enriquecida com EPE, cujos valores de FSH eram semelhantes e os de LH diferiam entre si. Verificaram não existir nenhum melhoramento na ovulação ou taxas de recuperação embrionária no grupo que recebeu EPE sem LH e concluíram que os tratamentos superovulatórios aumentam as taxas de ovulação mas não afectam a recolha embrionária por ovulação. Em 2001, um outro estudo (Alvarenga et al) comparou o efeito da administração de EPE em doses únicas ou duas vezes ao dia, verificando que a administração bi-diária de altas doses de EPE melhorou significativamente o desenvolvimento folicular, a ovulação e a recolha embrionária quando comparado com as administrações individuais.

Apesar da resposta ser muito inferior à verificada em vacas, ovelhas e humanos, a égua tem capacidade de responder à FSH (sob a forma de EPE). Em média espera-se que a resposta seja 3 a 4 vezes maior que a taxa de ovulação normal (Alvarenga et al, 2001)

#### 5.1.2- FSH

Estudos iniciais (Squires, Garcia, Ginther, Voss & Seidel, 1986), verificaram que o FSH não era tão eficiente como o EPE, com taxas de ovulação de 2.2 para o EPE, 1.6 para FSH e 1.0 para o controlo.

Em 2003, Niswender et al verificaram que a utilização de FSH equino aumentava as taxas de gestação e a recolha embrionária. Outros estudos utilizando FSH equino mostraram taxas de recuperação embrionária eficientes, bem como múltiplas ovulações (Welch et al, 2005; Logan, McCue, Alonso & Squires, 2007).

---

<sup>4</sup> McKinnon & Squires, 2001 de Guillou F, Combarnous Y. Purification of equine gonadotropins and comparative study of their acid-dissociation and receptor-binding specificity. *Biochim Biophys Acta*. 1983 Jan 25;755(2):229-36

Meyers-Brown et al (2010) realizaram um estudo onde utilizaram uma cadeia única de FSH equino recombinante (reFSH) para avaliar a sua eficácia na estimulação do desenvolvimento folicular e no aumento das taxas de ovulação em éguas cíclicas. Em estudos anteriores, nomeadamente de Niswender et al (2003), tratamentos com FSH equino aumentavam o número de folículos de dimensão superior a 35 mm, as ovulações por égua e a recolha embrionária mas não aumentavam o *ratio* embriões por ovulação quando comparados com o grupo de controlo. Assim, Meyers-Brown et al (2010), utilizando reFSH geneticamente clonada desprovida de LH verificaram um aumento no número de tratamentos para se obter folículos com diâmetro superior a 35 mm, no número de folículos de diâmetro superior a 35 mm, nas taxas de ovulação e no número de embriões por lavagem quando comparados com o controlo. No entanto, o *ratio* embriões por ovulação era o mesmo nos três grupos utilizados no estudo sugerindo que a reFSH é semelhante à FSH equino e ao EPE, de modo que o reFSH não melhora a maturidade dos oócitos quando entram no oviduto. Isto poderá ser resultado da supressão do LH endógeno devido ao feedback negativo das concentrações de estradiol no plasma produzido por um maior número de folículos pré-ovulatórios ou pelos altos níveis de inibina que têm um efeito negativo na maturação oocitária.

#### 5.1.3- Vacinação contra a inibina

A inibina é produzida pelas células da granulosa do folículo dominante. Tem como acção bloquear a produção de FSH, estando inversamente relacionada com o FSH em todos os estádios do ciclo (McKinnon & Squires, 2007). O aumento da FSH através da imunização da inibina, aumentou as taxas de ovulação em bovinos e ovinos vacinados contra a subunidade alfa da inibina. McKinnon et al foram os primeiros a indicar o uso da imunização da inibina para aumentar as taxas de ovulação em éguas (McKinnon, Brown, Pashen, Greenwood, Vasey, 1992). As éguas foram imunizadas no dia 0 e no dia 35. As taxas de ovulação pré imunização e no grupo de controlo foram de 1.2 por ciclo. Entre as duas imunizações, as taxas de ovulação eram de 1.86 e subiram para 2.29 por ciclo, após o término do tratamento. Todas as éguas tiveram ovulações duplas ou triplas. Apesar de se ter obtido sucesso com a imunização contra a inibina, não se consegue produzir um grande número de ovulações pelo que é necessário mais pesquisa a este respeito.

#### **5.2 Criopreservação de embriões**

A criopreservação de embriões tem o potencial de simplificar consideravelmente a transferência de embriões permitindo separar a recolha e a transferência de embriões no tempo e no espaço (Stout, 2006). Assim, a criopreservação de embriões, apresenta diversas

vantagens entre elas a possibilidade de armazenar embriões indefinidamente, preservando importantes linhas genéticas. Os embriões podem ser recolhidos de dadoras e transferidos para as receptoras mais tarde, minimizando, deste modo, o número de receptoras e os custos a elas associados. Os embriões podem ser transportados e exportados para outros países sem preocupações em relação à existência de receptoras cíclicas (McKinnon & Squires, 2007).

No entanto, tal como a superovulação, a criopreservação de embriões é uma técnica que levou à frustração tanto os investigadores como os profissionais (Stout, 2006). Apesar do primeiro relato do nascimento de um poldro nascido de um embrião congelado datar de 1982, este foi o único resultante de três gestações provenientes de 11 transferências<sup>5</sup>.

Estudos subsequentes estabeleceram que, independentemente do crioprotector utilizado, só são alcançadas taxas de gestações aceitáveis (50-60%) se os embriões forem congelados em estádios iniciais do seu desenvolvimento (mórula ou blastocisto inicial) e se forem menores que 300 µm (Squires et al, 2003).

Biologicamente, o embrião equino é único no modo como forma uma membrana proteica acelular, denominada cápsula, aproximadamente no D7, que impede a penetração de crioprotectantes e torna muito difícil o congelamento de blastocistos e de blastocistos expandidos<sup>6</sup>. Legrand et al (2003) relataram que o número de células mortas é directamente proporcional à espessura da cápsula e que esta impede a entrada do glicerol nas células embrionárias. Em estudos científicos subsequentes, estes autores expuseram embriões equinos de dimensões superiores a um tratamento enzimático para digestão da cápsula antes de congelá-los. Os resultados foram, porém, discrepantes. Se por um lado a digestão da cápsula permite a entrada do crioprotector por outro predispõe à perda do embrião durante o seu manuseio pois a ausência da cápsula é prejudicial à sobrevivência do embrião *in vivo* (Stout, Meadows & Allen, 2005). Assim, a dificuldade em criopreservar blastocistos equinos expandidos poderá estar relacionada com a presença da cápsula mas também com o grau de diferenciação do embrião, com a grande quantidade de fluido no blastocelo ou apenas com a dimensão do embrião (Choi et al, 2011).

As dimensões adequadas para congelar o embrião com maiores taxas de sucesso persistem num período de tempo restrito logo após a chegada do embrião ao útero entre as 144 e 168 horas pós-ovulação (Battut et al, 1997). Eldridge-Panuska, di Brienza, Seidel, Squires & Carnevale (2005) descreveram um sistema para recolher embriões de dimensões adequadas ao congelamento, nomeadamente fazendo uma lavagem oito dias após a indução da ovulação

---

<sup>5</sup> Stout 2006 de Yamamoto Y, Oguri N, Tsutsumi Y, Hachinohe Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. J Reprod Fertil Suppl. 1982;32:399-403).

<sup>6</sup> Squires et al 2003 de Legrand E, Krawiecki JM, Tainturier D, Corniere P, Delajarraud H, Bruyas J-F. Does the embryonic capsula impede the freezing of equine embryos? In: Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer. Havemeyer Foundation Monogr Ser 2000;3:62-5

com hCG (assumindo que a ovulação ocorre aproximadamente 36h após a administração do hCG). Baseado no fundamento que, aproximadamente 5 dias após a ovulação, o embrião equino secreta prostaglandina E2 (PGE2) que relaxa a musculatura lisa do oviducto e permite a passagem do embrião para o útero, Robinson, Neal et Allen (2000), aplicaram um gel de PGE2 no oviducto ipsilateral 4 dias após a ovulação sendo capazes de recolher do útero embriões em estadio inicial de desenvolvimento um dia depois. Esta técnica não foi, no entanto, adoptada na prática clínica uma vez que o gel de PGE2 tem de ser aplicado por via laparoscópica.

Em relação ao crioprotector ideal, vários estudos foram realizados. Meira et al (1993) compararam o glicerol com o 1,2-propanediol, em que o glicerol mostrou-se superior como crioprotector.

Ferreira et al (1997) avaliaram a combinação de glicerol com 1,2-propanediol como tratamentos crioprotectores. Estes relataram não existir vantagens na adição de 1,2-propanediol. Ainda, aquando de uma análise da ultra-estrutura dos embriões, verificaram que existiam diferenças marcantes entre embriões congelados e embriões a fresco. Bruyas et al (2000) verificaram que nenhum dos embriões congelados em etilenoglicol apresentava células viáveis após descongelação, enquanto que aqueles congelados em glicerol não apresentavam células lisadas ou mortas após congelação e descongelação. Estes autores concluíram que o etilenoglicol era um fraco crioprotector para embriões equinos.

A vitrificação é um processo mais rápido que a criopreservação lenta e não necessita de equipamento especializado. A adição do crioprotector é feita na própria palhinha e o embrião pode ser directamente transportado para a égua sem necessidade de ser removido da palhinha (Eldridge-Panuska et al, 2005). Hudson et al (2006) conduziram um estudo científico onde compararam as taxas de gestação de embriões equinos vitrificados imediatamente após a recolha e embriões refrigerados durante 12 a 19h e depois vitrificados, observando que embriões equinos pequenos (com dimensão inferior a 300  $\mu$ m) podem ser armazenados a 5-8°C de 12 a 19h antes da vitrificação sem perda significativa da sua viabilidade.

Choi et al (2011) conseguiram obter gestações normais a partir de blastocistos expandidos criopreservados com dimensões até 650  $\mu$ m. Neste estudo, os investigadores usaram uma técnica em que se colapsava o blastocele antes da vitrificação. Com base nos seus resultados concluiu-se que mais do que a interferência da cápsula à penetração do crioprotectante, é o volume reduzido do embrião que condiciona as taxas de gestação. O tipo de crioprotectante utilizado na vitrificação afecta a viabilidade do embrião mas é o método usado para fazer colapsar o blastocele que afecta as taxas de gestação.

## 6.Outras técnicas reprodutivas assistidas

Existe uma variação substancial entre as técnicas reprodutivas assistidas no que diz respeito à sua complexidade, custo, indicações e taxas de sucesso. O custo do procedimento está directamente relacionado com a sua complexidade, com o pessoal envolvido e custos laboratoriais implicados. Os procedimentos que requerem um equipamento mais caro e pessoal melhor treinado, como a injeção espermática intracitoplasmática (ICSI), são mais dispendiosos. Ainda, os procedimentos mais exigentes a nível financeiro são, geralmente, os que têm menores taxas de sucesso como descrito na tabela 3 (Coutinho da Silva, 2008).

**Tabela 4:** Complexidade, custo e taxas de sucesso em técnicas de reprodução assistidas usadas na prática equina (adaptado de Coutinho da Silva, 2008).

Procedimento <sup>a</sup>	Complexidade	Custo	Taxa de sucesso
TE	+	X	33-38 <sup>b</sup>
TO	++	1.25-1.5X	23-27 <sup>b</sup>
ICSI	+++	1.5-2.0X	13-18 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> TE- transferência de embriões; TO- transferência de oócitos; ICSI- injeção espermática intracitoplasmática.

<sup>b</sup> Taxas de sucesso por ciclo baseadas na recolha e taxa de gestação.

<sup>c</sup> Taxas de sucesso por ciclo baseadas na taxa de blastocistos e taxa de gestação.

### 6.1 Transferência de oócitos

A transferência de oócitos (TO) tem sido utilizada para obter gestações a partir de éguas que não são boas dadoras de embriões devido a várias condições reprodutivas patológicas (Carnevale, Squires, Maclellan, Alvarenga & Scott, 2001). Uma vez que a fertilização, o desenvolvimento embrionário e o desenvolvimento fetal ocorrem na receptora, as condições patológicas associadas com a ovulação e genitália tubular das dadoras, podem ser evitadas (Carnevale, 2007). Assim, o único requisito para a égua dadora de oócitos é a capacidade de produzir um folículo pré-ovulatório que contenha um oócito saudável (Coutinho da Silva, 2008). O oócito é então removido do folículo antes da ovulação e transferido para uma receptora jovem, onde se irá verificar a fertilização e desenvolvimento embrionário. Consequentemente, as indicações para a TO incluem falhas na ovulação, patologia grave do oviducto, útero ou cérvix incluindo infecção uterina crónica, laceração cervical e cicatriz uterina/do oviducto.

O primeiro poldro resultante de uma TO nasceu em 1988 (McKinnon, Carnevale & Squires, 1988). No entanto, a técnica só foi utilizada comercialmente depois dos anos 90 (Carnevale et



al, 2001). Taxas de sucesso de 92% foram alcançadas aquando da transferência de oócitos de dadoras jovens para receptoras jovens (Carnevale & Ginther, 1995).

A recolha de oócitos de folículos ováricos foi realizada por vários métodos nomeadamente por laparotomias, colpotomias, punctura no flanco e aspiração folicular transvaginal guiada ecograficamente (Carnevale, 2007). Actualmente, o método de escolha é a aspiração folicular transvaginal pois tem a vantagem de não ser um procedimento cirúrgico, permitindo repetidas aspirações sem subsequente decréscimo na fertilidade da égua dadora. (Vanderwall, Hyde & Woods, 2006).

De um modo geral, a TO é um procedimento mais elaborado que a TE pois requer um investimento considerável em equipamento e treino da equipa. Uma vez que o oócito é uma célula única, é mais sensível que o embrião a alterações na temperatura, pH, osmolalidade e danos físicos (Coutinho da Silva, 2008). O procedimento de TO requer, ainda, equipamento para cultura de células e uma boa técnica estéril para preparação do meio e manipulação dos oócitos. Além disso, os oócitos são transferidos para o oviducto das receptoras por laparotomia do flanco, necessitando de instrumentos apropriados para o efeito.

A percentagem de recolha de oócitos a partir de folículos pré-ovulatórios varia entre 65 a 75% e a taxa média de gestação após a transferência de oócitos de dadoras idosas é de aproximadamente 35% (Carnevale, Coutinho da Silva, Panzani, Stokes & Squires, 2005). Assim, a taxa de sucesso para uma TO varia de 23 a 27% por ciclo.

A transferência de oócitos tem o potencial de ser utilizada na obtenção de gestações de éguas e ganhanhos subférteis, éguas que já morreram e de oócitos congelados (Carnevale, 2007). A utilização da TO proporciona aos proprietários de equinos e aos clínicos novas possibilidades para obtenção de poldros.

## **6.2 Fertilização *In Vitro***

Em diversas espécies domésticas, bem como em humanos, a produção de embriões *in vitro* é relativamente comum. No entanto, no cavalo, a obtenção de embriões através da fertilização *in vitro* (FIV) não é um procedimento rotineiro. Esta técnica poderia ser muito útil no caso de éguas com problemas de fertilidade e incapazes de produzirem embriões. Além disso, a FIV poderia ser utilizada em programas de reprodução que envolvessem ganhanhos com um número reduzido de espermatozóides e baixa qualidade do sémen bem como em laboratórios de teste para avaliação de sémen congelado. A possibilidade de produzir embriões equinos *in vitro* seria bastante benéfica no fornecimento de embriões para estudos subsequentes nomeadamente no congelamento de embriões e cultura de embriões (Squires et al, 2003). No entanto, apenas dois poldros nasceram de técnicas de FIV, sendo que o primeiro parto ocorreu

em 1990 (Palmer, Bézard, Magistrini & Duchamp, 1991). Ambos os poldros foram resultado de oócitos recuperados de folículos maduros de éguas *ex vivo*.

A maior dificuldade associada à FIV no cavalo parece ser a penetração da zona pelúcida, pois as taxas de fertilização aumentam grandemente se for feita uma abertura na zona pelúcida antes que os espermatozóides entrem em contacto com os oócitos (Choi et al, 1994). Tal facto foi conseguido removendo uma porção da zona pelúcida através de micromanipulação ou produzindo-se um orifício na zona por dissolução, usando um jacto directo de uma solução de ácido, também através da micromanipulação. Apesar de se obterem altas taxas de fertilização com este método (mais de 80%), verificou-se frequentemente polispermia uma vez que a principal barreira a esta foi ultrapassada (Choi et al, 1995). Embora a proporção de oócitos que sofre de polispermia possa ser reduzida através da manipulação do número de espermatozóides, alguns riscos permanecem, pelo que estes métodos não são recomendados (Hinrichs, 2007). Ainda, estas técnicas requerem micromanipulação, com equipamento e trabalho semelhante à injeção espermática intracitoplasmática (ICSI). A ICSI mostrou ser um método mais eficiente e repetível na fertilização *in vitro* de oócitos equinos sendo, portanto, o método de eleição.

Os oócitos utilizados para a ICSI podem ser obtidos *ex vivo* por aspiração de folículos pré-ovulatórios na éguas (semelhante à transferência de oócitos) ou obtidos por maturação *in vitro* de oócitos recolhidos de folículos imaturos, seja *ex vivo*, seja *post-mortem* (Hinrichs, 2005). Uma das principais vantagens da ICSI é que requer um número muito reduzido de espermatozóides, permitindo a produção de descendentes de garanhões subférteis (Coutinho da Silva, 2008).

Os embriões fertilizados por ICSI podem ser imediatamente transferidos para o oviducto da égua receptora por laparotomia no flanco ou ficarem em cultura 7-8 dias para atingir o estadio de blastocisto. Os blastocistos são então transferidos não cirurgicamente para o útero da égua receptora. Em alternativa, os embriões podem ser criopreservados e armazenados antes da transferência. Campos-Chillon et al referiram taxas de gestação na ordem dos 62% após vitrificação e aquecimento (Campos-Chillon, Suh, Barcelo-Fimbres, Seidel, Carnevale, 2009). A ICSI é um procedimento mais complexo que a TO, extremamente especializado e requer instrumentação dispendiosa e técnicos com experiência para executar as injeções. Até a data (Coutinho da Silva, 2008), o uso clínico da ICSI nos cavalos é limitado pelo custo do procedimento e as baixas taxas de sucesso na recolha e maturação dos oócitos.

Uma das maiores vantagens da ICSI quando comparada com a TO é que apenas oócitos com capacidade de se desenvolverem em blastocistos são transferidos para a égua receptora. No

entanto, o desenvolvimento do estadio de blastocisto dos oócitos injectados é baixo (Coutinho da Silva, 2008).

Em centros de investigação muito desenvolvidos, uma taxa de desenvolvimento dos blastocistos em torno aos 25 a 35% é consistentemente alcançada, com uma taxa de gestação após a transferência não cirúrgica dos embriões de 50% (Hinrichs, 2005).

Melhoramentos futuros nos protocolos de maturação oocitária *in vitro* bem como no de cultura de embriões, permitirá à ICSI ser mais eficiente e menos dispendiosa, aumentando o seu uso na prática equina (Coutinho da Silva, 2008).

## IV. Trabalho experimental

Para maximizar o sucesso de um programa de transferência de embriões, os factores que afectam a taxa de gestação e perda embrionária devem ser identificados. Os principais componentes de um programa de transferência de embriões incluem as receptoras, o embrião e o procedimento de transferência. As taxas de gestação após a transferência são influenciadas pela variabilidade entre estes componentes (Carnevale et al, 2000).

Na presente dissertação foram recolhidos dados respeitantes a 127 transferências de embriões no centro localizado na fazenda Santa Rita II durante três épocas reprodutivas: 2008-2009, 2009-2010 e 2010-2011. O objectivo deste estudo foi determinar quais os factores (sobretudo embriões e receptoras dado que a técnica e a operadora foram sempre as mesmas) tiveram efeitos significativos na taxa de gestação. Ao ser possível determinar quais os factores que influenciaram negativamente as taxas de gestação, estes podem ser alterados de modo a melhorar a eficiência de futuros programas de transferência de embriões.

### 1. Materiais e métodos

#### 1.1 Animais e manejo

##### -Éguas receptoras

Foram utilizadas 127 éguas de diferentes raças de idades entre os 4 e os 15 anos e com peso compreendido entre os 350 e 550 kg. A idade foi estimada no momento da compra das receptoras baseando-se nas suas características dentárias. Aquando da sua compra realizou-se, ainda, um exame ecográfico transrectal para avaliação do aparelho reprodutor. A história pregressa a respeito da sua fertilidade e partos era desconhecida.

As éguas receptoras foram mantidas em pastagem à base de *tifton* e *coast cross* suplementada em blocos de sal. Era fornecida ração quando as éguas vinham à manga de palpação.

Apenas um limitado número de receptoras (n=9) foi utilizado no período de transição, ou seja, antes da primeira ovulação do ano. Estas éguas foram tratadas com 0,03 mg de benzoato de estradiol durante dois a três dias. No dia sucessivo foram administrados 1500 mg de progesterona de longa acção (300mg/ml), sendo esta mantida até aos 120 dias no caso de se confirmar a gestação. A transferência foi realizada entre os dias 4 e 7

Em relação às receptoras cíclicas, estas foram examinadas por palpação e ecografia transrectal a intervalos regulares e diariamente durante o estro para detecção da dinâmica folicular, do momento da ovulação, edema uterino, presença de líquido ou ar no lúmen uterino e presença

do corpo lúteo. Consoante a necessidade de utilização das receptoras, realizava-se a indução da ovulação com hCG (vetecor®, hertope calier) que se verificava nas 36 h sucessivas ou após a administração de deslorelina aquando da presença de um folículo de dimensões superiores a 35mm e dobras endometriais.

No quinto dia após a ovulação, as receptoras candidatas à transferência de embriões eram novamente examinadas sobretudo em relação ao tónus e morfoecogenicidade uterina, segundo uma escala de um a quatro. Assim, um tónus uterino 1 correspondia a um tónus tenso, um tónus 2 era tenso mas menos que em 1, um tónus 3 equivalia a um útero mais flácido que 1 e 2 porém diferente do tónus em estro e finalmente um tónus 4 correspondia a um tónus flácido, sinónimo de um útero em estro. Em relação à morfoecogenicidade, a classificação 1 correspondia a um útero homogéneo e ecogénio, com poucas diferenças entre o miométrio e o endométrio; a morfoecogenicidade 2 era um útero heterogéneo, com maiores diferenças entre miométrio e o endométrio que o grau 1, com formato tubular, a morfoecogenicidade 3 apresentava uma diferença ainda maior entre miométrio e endométrio, sendo heterogéneo e com dobras endometriais ausentes. Finalmente a classificação de grau 4 correspondia a um útero heterogénio, pouco ecogénico com elevada diferença entre miométrio e endométrio, com formato pouco tubular e já com a presença de dobras endometriais. Foi através desta avaliação do útero que as receptoras foram classificadas em aceitáveis, quando o tónus e a morfoecogenicidade eram de grau 1 ou 2, marginais se o tónus ou a morfoecogenicidade eram de grau 3 e reprováveis pelo que não eram utilizadas se um dos parâmetros era de grau 3 e outro de grau 4 ou ambos de grau 4 (Alonso, 2007).

As receptoras eram utilizadas do terceiro ao nono dia pós ovulação e tentava-se sempre ter no mínimo três receptoras para cada transferência para que se pudesse escolher a que apresentava melhores parâmetros. As éguas que não eram utilizadas como receptoras neste período eram submetidas a uma injeção de PGF<sub>2α</sub> (Lutalyse®).

#### -Éguas dadoras

As éguas dadoras pertenciam a diversas raças nomeadamente Mangalarga, Puro-Sangue Árabe (PSA), Quarto de Milha e Brasileiro de Hipismo (BH). Algumas destas éguas encontravam-se na fazenda Santa Rita em regime de alojamento e a alimentação era variável consoante ao que estavam habituadas. Em outros casos, deslocávamo-nos ao local onde as éguas se encontravam para recolher o embrião que era transportado a fresco até à fazenda e sucessivamente transferido para a égua receptora escolhida.

As éguas dadoras eram examinadas ecograficamente para detecção de quistos, de fluído ou de ar e para controlo da dinâmica folicular. No caso da presença de líquido era realizado um

tratamento à base de ocitocina, 20 UI IV ou IM (OCITOCINA U.C.B®, da U.C.B) e/ou lavagens uterinas. Em certos casos a ovulação era induzida de modo semelhante ao que acontecia com as receptoras e estas eram inseminadas 24h depois com sémen fresco ou refrigerado. No dia seguinte realizava-se novo exame ecográfico para se verificar a ocorrência da ovulação. Caso esta não se verificasse 48h após a inseminação, inseminava-se novamente. O dia 0 do ciclo era considerado o dia em que se dava a ovulação. A lavagem para recolha do embrião era realizada no dia 7 ou 8 após a ovulação. Uma vez que esta era realizada sempre pela mesma operadora, não constitui uma variável a ter em conta aquando da análise dos dados. O embrião era posteriormente transferido transcervicalmente para a receptora estipulada.

Após a recolha do embrião era administrada PGF<sub>2α</sub> (Lutalyse®) às éguas dadoras de modo que as mesmas retornassem ao estro.

O diagnóstico de gestação das receptoras era realizado 7 dias após a transferência, ou seja, com cerca de 15 dias de gestação, aos 30 dias de gestação para verificar-se a existência de batimento cardíaco e aos 45 dias, dia este em que a receptora era transportada para a casa do proprietário do embrião e lá permanecia até 6 meses após o parto, altura em que se procedia à desmama do poldro.

A classificação morfológica do embrião bem como o seu estadio de desenvolvimento e dimensão era realizada com o auxílio da lupa. Os embriões eram classificados de 1 a 4. A classificação de grau 1 correspondia a um embrião excelente, a de grau 2 a um embrião bom; os embriões de grau 3 eram considerados razoáveis e os de grau 4 inferiores ou maus.

## 1.2 Análise estatística

Os dados foram recolhidos ao longo de 127 transferências de embriões. A fazenda Santa Rita oferece o serviço de aluguer de receptoras a terceiros. No entanto, somente os embriões recolhidos e transferidos pela Dr<sup>a</sup>. Maria Augusta Alonso foram considerados na análise de modo que o técnico não fosse um factor de influência. Falhas em recolher alguma informação resultaram na ausência de certos parâmetros em algumas das transferências, como tal, realizou-se uma análise univariada sobre os factores que potencialmente poderiam influenciar o sucesso do estabelecimento de uma gestação.

Foi realizada uma base de dados em Microsoft Excel® que foi importada para o programa *R Development Core Team®* (*R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria, 2008).

Todas as variáveis analisadas eram qualitativas. Deste modo, foram examinadas pelo teste exacto de Fisher em tabelas de contingência 2 X 2 e as diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ . Os intervalos de confiança para proporções foram calculados

recorrendo à extensão do programa R binom nomeadamente da função `binom.confint` e foi utilizado o método de Wilson. Os seguintes factores foram examinados em relação ao possível efeito na taxa de gestação após a transferência e morte embrionária, sendo alguns relacionados com as receptoras e outros relacionados com o embrião: época reprodutiva (2008/2009, 2009/2010 e 2010/2011), ovulação do ano (primeira ovulação do ano e subsequentes ovulações), qualidade da receptora que foi definida em função do tónus e morfoecogenicidade uterina (aceitável, marginal e reprovável) e tipo de cio (natural ou artificial). Apesar de poder constituir um factor importante na análise dos dados, não foi possível examinar a influência da idade das receptoras nas taxas de gestação uma vez que só se teve acesso à idade aproximada das receptoras pelo exame dentário no momento da compra das mesmas, sendo que esse valor não ficou registado nas fichas dos animais. Em relação aos factores relacionados com os embriões analisou-se o estadio de desenvolvimento do embrião (blastocisto/blastocisto inicial e blastocisto expandido), o diâmetro do embrião antes da transferência em  $\mu\text{m}$  (até 299, 300 a 599, 600 a 999 e de 1000 a 1600) e a qualidade morfológica (graus 1, 2 e 3/4). Para melhor visualização das variáveis analisadas, estas estão descritas na tabela 4.

A taxa de gestação é definida para cada factor como o número de animais gestantes sobre o número total de animais que apresentam essa informação. A taxa da morte embrionária é encontrada através da diferença da gestação aos 45 dias e a gestação aos 15 dias. Para efeitos da análise estatística, o dia de transferência foi definido como dia 7 de gestação.

**Tabela 5:** Variáveis analisadas com eventual influência na taxa de gestação.

Época reprodutiva	2008/2009 2009/2010 2010/2011
Ovulação do ano	1º Cio do ano Outros cios
Qualidade da receptora	Aceitável Marginal Reprovável
Tipo de Cio	Normal Artificial
Estadio de desenvolvimento do embrião	Blastocisto (BL)/Blastocisto inicial (BLI) Blastocisto expandido (BLX)
Diâmetro do embrião (µm)	Até 299 300 a 599 600 a 999 1000 a 1600
Qualidade morfológica do embrião	1 (excelente) 2 (bom) 3/4 (razoável/inferior ou mau)

## 2. Resultados

Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas e gráficos.

### 2.1 Época

Apesar da época de 2009/2010 ser a que apresenta uma menor taxa de gestação, não se verificou uma influência significativa da época na taxa de gestação aquando da realização do teste de Fisher pois  $p > 0,05$ . Em relação à influência da época na morte embrionária não se verificaram diferenças estatisticamente significativas.

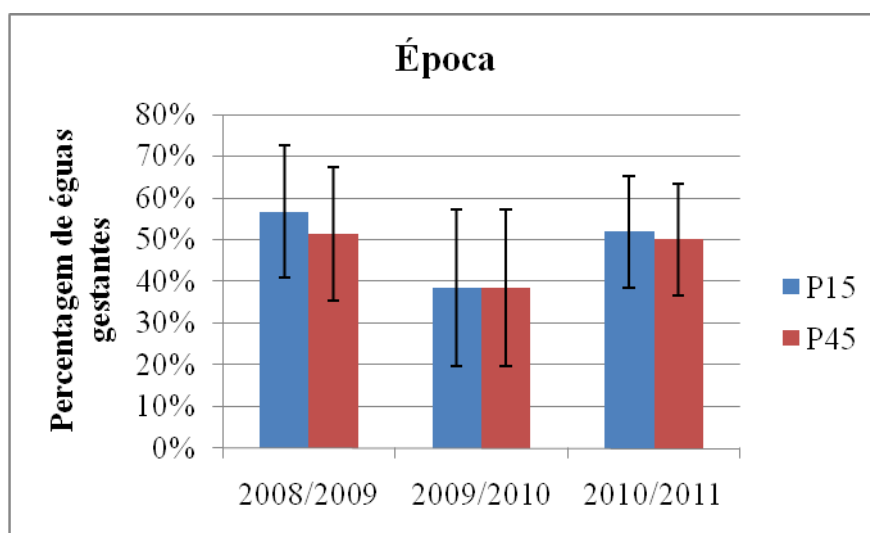


**Tabela 6:** Taxas de gestação e morte embrionária consoante a época.

Época	Taxa de gestação		Morte embrionária
	15d	45d	
<b>2008/2009</b>	56,8% (21/37)	51,4% (19/37)	5,4%
<b>2009/2010</b>	38,5% (10/26)	38,5% (10/26)	0
<b>2010/2011</b>	51,9% (28/54)	50% (27/54)	1,9%

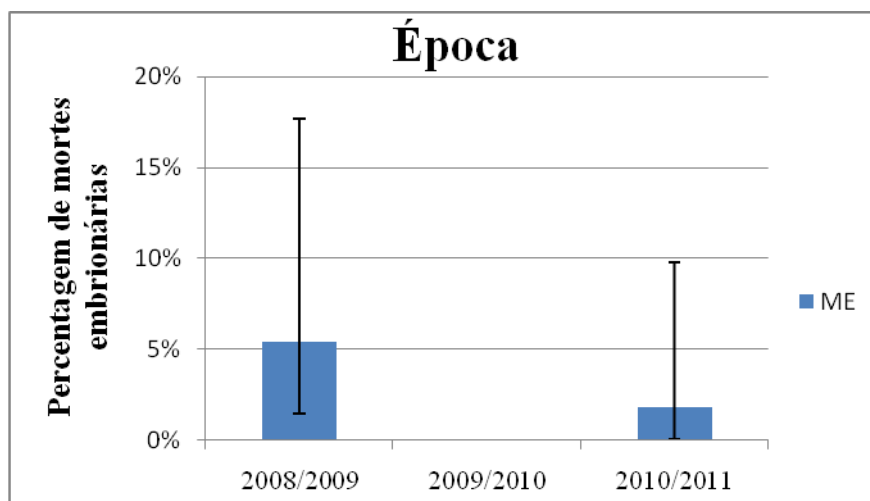
d15- aos 15 dias; d45- aos 45 dias .

**Gráfico 1:** Influência da época reprodutiva na taxa de gestação.



Barras correspondem a valores médios  $\pm$  desvio padrão. Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ) . P15= gestação aos 15 dias; P45= gestação aos 45 dias.

**Gráfico 2:** Influência da época reprodutiva na morte embrionária.



Barras correspondem a valores médios  $\pm$  desvio padrão. Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ) . ME= morte embrionária

## 2.2 Factores relacionados com as receptoras

**Tabela 7:** Influência da égua receptora nas taxas de ovulação e morte embrionária no total das épocas reprodutivas.

Variável	Gestação aos 15 dias	Gestação aos 45 dias	Morte embrionária
<b>Ovulação do ano</b>			
1ª Ovulação do ano	13/27 (48,1%)	13/27 (48,1%)	0
Ovulações seguintes	34/65 (52,3%)	31/65 (47,7%)	4,60%
<b>Qualidade da receptora</b>			
Aceitável	41/59 (69,4%)	39/59 (66,1%)	3,30%
Marginal	4/12 (33,3%)	4/12 (33,3%)	0
<b>Tipo de cio</b>			
Normal	47/92 (51,1%)	44/92 (47,8%)	3,30%
Artificial	3/9 (33,3%)	3/9 (33,3%)	0

**Tabela 8:** Influência da égua receptora nas taxas de gestação e morte embrionária na época reprodutiva de 2010/2011.

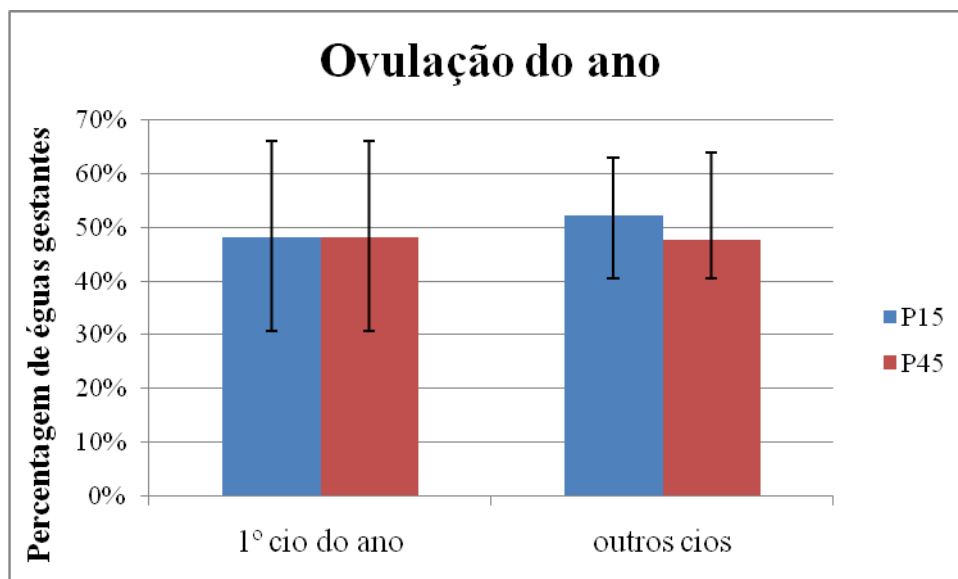
Variável	Gestação aos 15 dias	Gestação aos 45 dias	Morte embrionária
<b>Ovulação do ano</b>			
1ª Ovulação do ano	5/10 (50%)	5/10 (50%)	0
Ovulações seguintes	18/35 (51,4%)	17/35 (48,6%)	2,80%
<b>Qualidade da receptora</b>			
Aceitável	21/38 (55,3%)	20/38 (52,6%)	2,70%
Marginal	0	0	0
<b>Tipo de cio</b>			
Normal	24/45 (53,3%)	23/45 (51,1%)	2,20%
Artificial	1/1 (100%)	1/1 (100%)	0

### 2.2.1 Ovulação do ano

No total das épocas reprodutivas estudadas, o facto de se tratar da primeira ovulação do ano ou das subsequentes, não parece ter influenciado a taxa de gestação (gráfico 3).

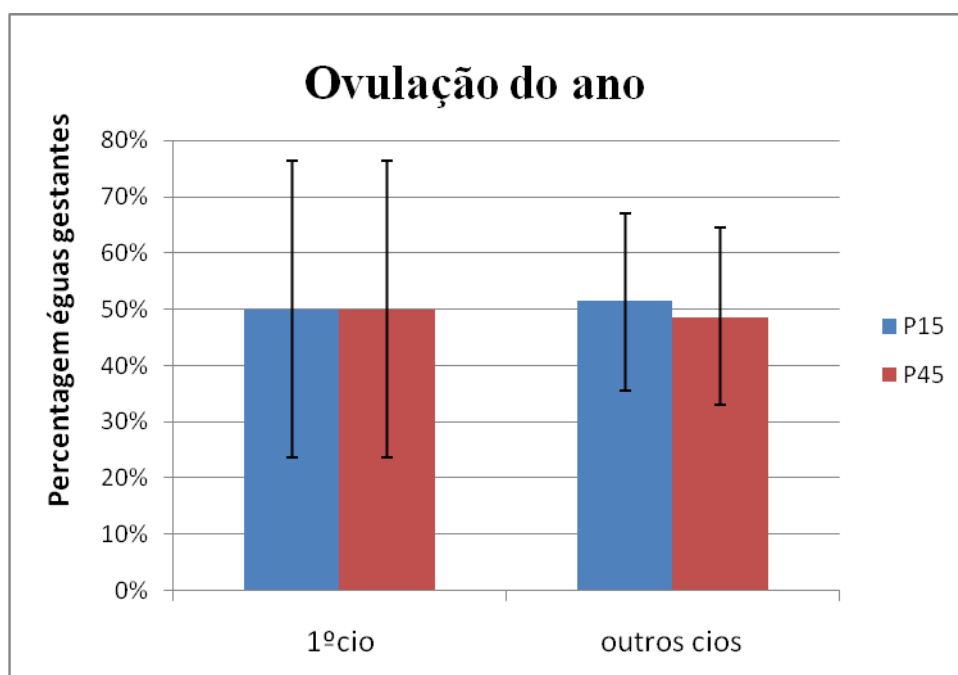
Especificamente na época reprodutiva de 2010/2011, a variável ovulação do ano não influenciou a taxa de gestação (gráfico 4).

**Gráfico 3:** Influência da ovulação do ano na taxa de gestação no total das épocas reprodutivas.



Barras correspondem a valores médios  $\pm$  desvio padrão. Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). P15= gestação aos 15 dias; P45= gestação aos 45 dias.

**Gráfico 4:** Influência da ovulação do ano na taxa de gestação na época de 2010/2011.

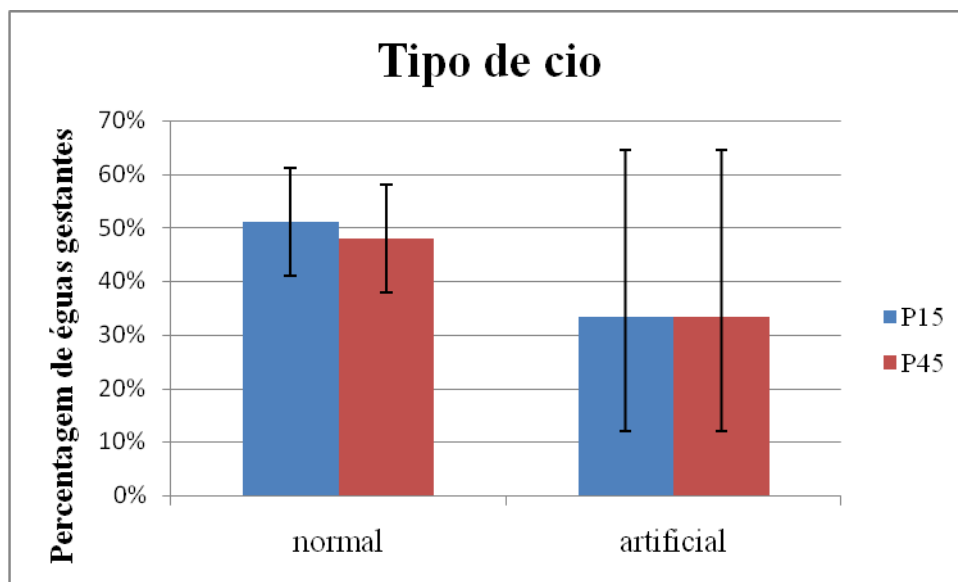


Barras correspondem a valores médios  $\pm$  desvio padrão. Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). P15= gestação aos 15 dias; P45= gestação aos 45 dias.

### 2.2.2 Tipo de cio

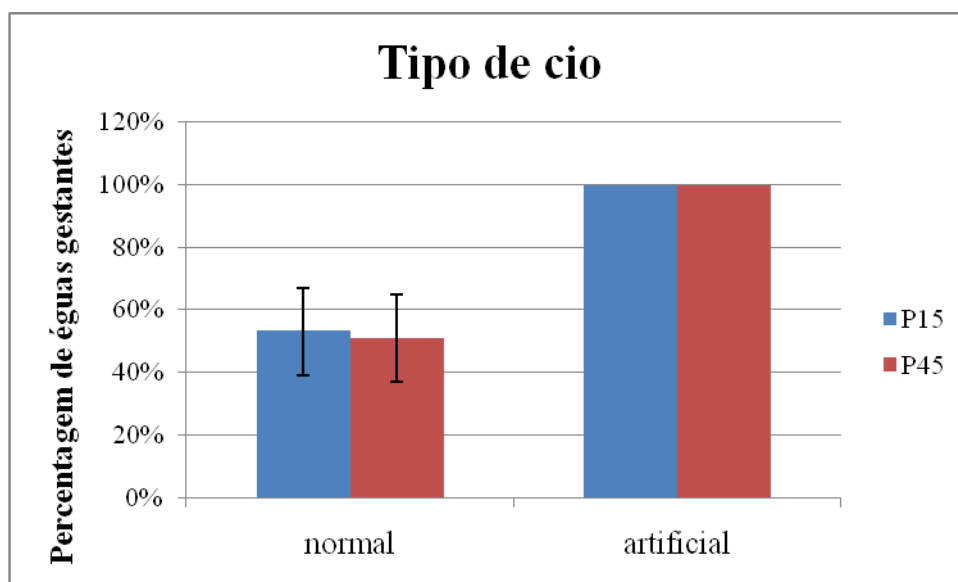
No total das épocas reprodutivas estudadas, o tipo de cio, normal ou artificial, não parece ter influenciado a taxa de gestação (gráfico 5). Na época reprodutiva de 2010/2011, o tipo de cio não influenciou a taxa de gestação (gráfico 6).

**Gráfico 5:** Influência do tipo de cio na taxa de gestação no total das épocas reprodutivas.



Barras correspondem a valores médios  $\pm$  desvio padrão. Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). P15= gestação aos 15 dias; P45= gestação aos 45 dias.

**Gráfico 6:** Influência do tipo de cio na taxa de gestação na época de 2010/2011.

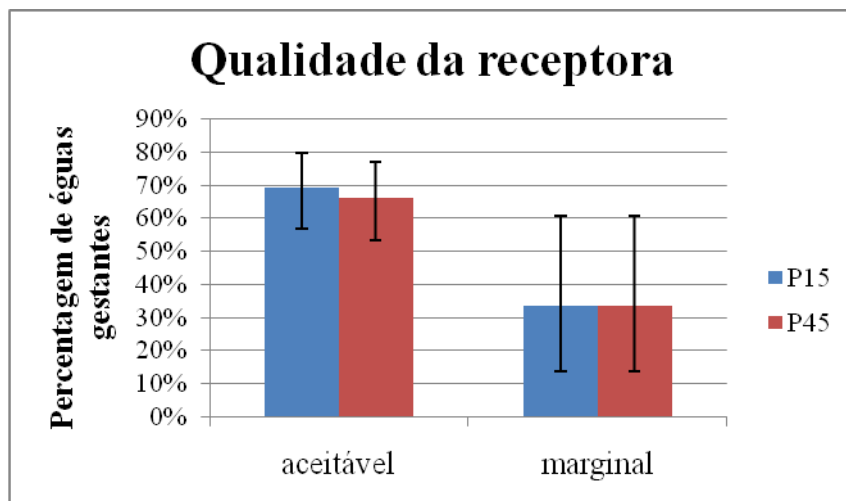


Barras correspondem a valores médios  $\pm$  desvio padrão. Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). P15= gestação aos 15 dias; P45= gestação aos 45 dias.

### 2.2.3 Qualidade da receptora

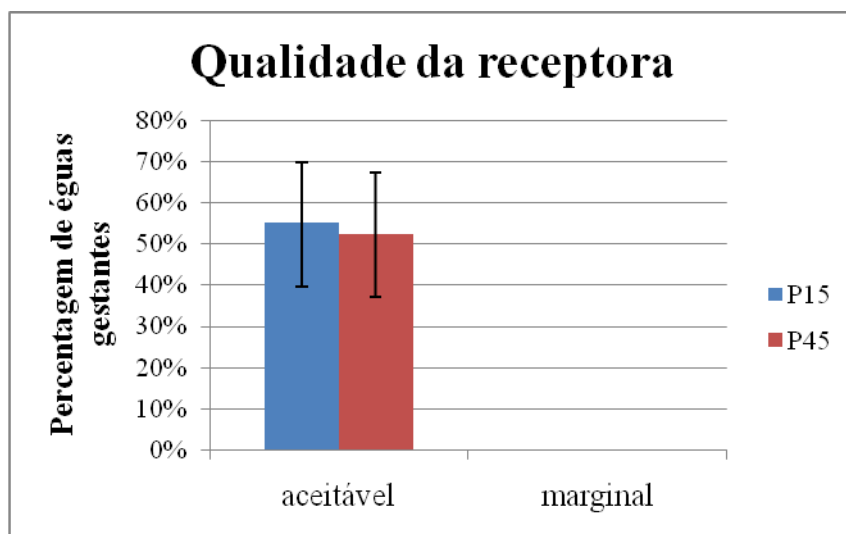
No total das épocas reprodutivas estudadas, a qualidade da receptora não parece ter influenciado a taxa de gestação. Apenas as receptoras "aceitáveis" e "marginais" foram utilizadas (gráfico 7). Na época reprodutiva de 2010/2011 todas receptoras utilizadas eram "aceitáveis" (gráfico 8).

**Gráfico 7:** Influência da qualidade da receptora na taxa de gestação no total das épocas reprodutivas.



Barras correspondem a valores médios  $\pm$  desvio padrão. Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). P15= gestação aos 15 dias; P45= gestação aos 45 dias.

**Gráfico 8:** Influência da qualidade da receptora na taxa de gestação na época reprodutiva de 2010/2011.



Barras correspondem a valores médios  $\pm$  desvio padrão. Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). P15= gestação aos 15 dias; P45= gestação aos 45 dias.

### 2.3 Factores relacionados com os embriões

**Tabela 9:** Influência do embrião nas taxas de gestação e morte embrionária no total das épocas reprodutivas.

Variável	Gestação aos 15 dias	Gestação aos 45 dias	Morte embrionária
<b>Estadio de desenvolvimento</b>			
BL/BLI	4/7 (57,1%)	4/7 (57,1%)	0
BLX	42/80 (52,5%)	40/80 (50%)	2,50%
<b>Diâmetro (µm)</b>			
Até 299	5/7 (71,4%)	5/7 (71,4%)	0
300 a 599	22/36 (61,1%)	21/36 (58,3%)	2,8
600 a 999	13/26 (50%)	13/26 (50%)	0
1000 a 1600	6/11 (54,5%)	5/11 (45,5%)	9%
<b>Grau morfológico</b>			
1 (excelente)	37/65 (57%)	35/65 (53,8%)	3,20%
2 (bom)	7/13 (53,8%)	7/13 (53,8%)	0
3/4 (razoável; inferior/mau)	2/9 (22,2%)	2/9 (22,2%)	0

BL= blastocisto; BLI= blastocisto inicial; BLX= blastocisto expandido

**Tabela 10:** Influência do embrião nas taxas de gestação na época reprodutiva de 2010/2011.

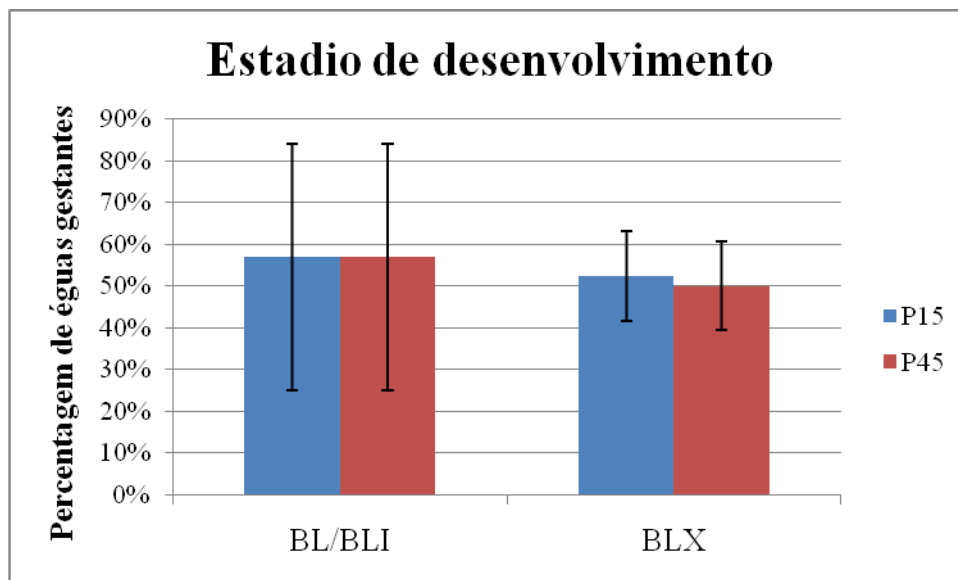
Variável	Gestação aos 15 dias	Gestação aos 45 dias
<b>Estadio de desenvolvimento</b>		
BL/BLI	1/2 (50%)	1/2 (50%)
BLX	18/30 (60%)	18/30 (60%)
<b>Diâmetro (µm)</b>		
Até 299	2/3 (66,7%)	2/3 (66,7%)
300 a 599	9/14 (64,3%)	9/14 (64,3%)
600 a 999	7/12 (58,3%)	7/12 (58,3%)
1000 a 1600	0	0
<b>Grau morfológico</b>		
1 (excelente)	12/28 (60,1%)	12/28 (60,1%)
2 (bom)	2/3 (66,7%)	2/3 (66,7%)
3/4 (razoável; inferior/mau)	0/3 (0%)	0/3 (0%)

BL= blastocisto; BLI= blastocisto inicial; BLX= blastocisto expandido

### 2.3.1 Estádios de desenvolvimento

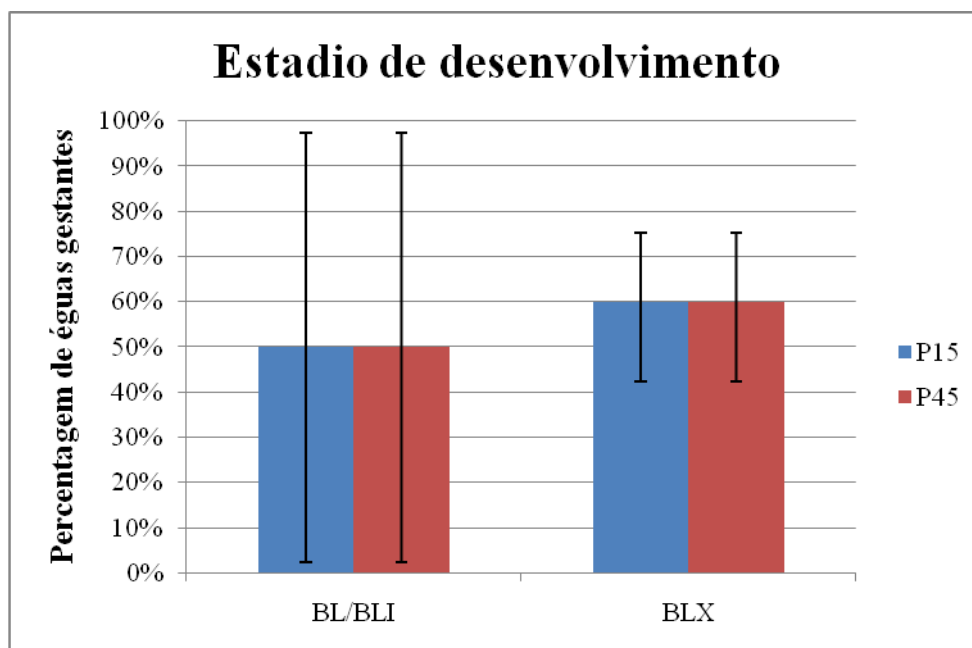
No total das épocas reprodutivas estudadas (gráfico 9) e, especificamente na época reprodutiva de 2010/2011 (gráfico 10) o estadio de desenvolvimento do embrião não influenciou a taxa de gestação.

**Gráfico 9:** Influência do estadio de desenvolvimento do embrião na taxa de gestação no total das épocas reprodutivas.



Barras correspondem a valores médios  $\pm$  desvio padrão. Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). P15= gestação aos 15 dias; P45= gestação aos 45 dias.

**Gráfico 10:** Influência do estadio de desenvolvimento do embrião na taxa de gestação na época reprodutiva de 2010/2011.

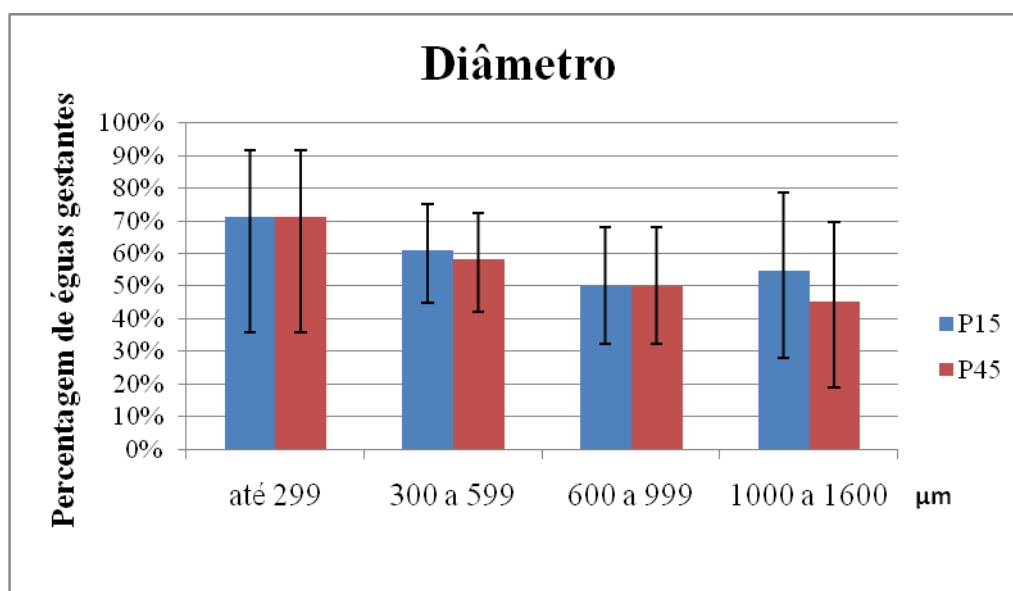


Barras correspondem a valores médios  $\pm$  desvio padrão. Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). P15= gestação aos 15 dias; P45= gestação aos 45 dias.

### 2.3.2 Diâmetro do embrião

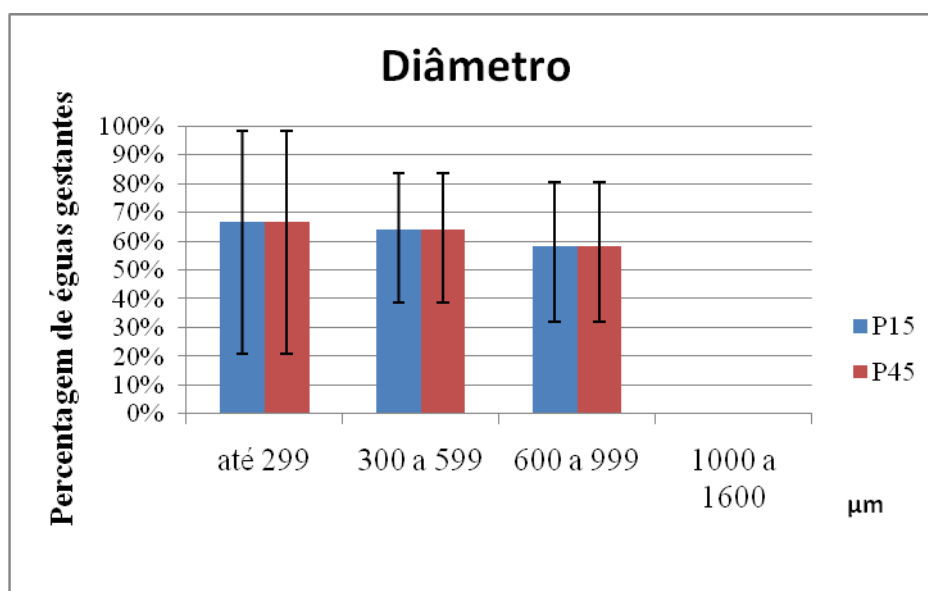
No total das épocas reprodutivas estudadas e na época de 2010/2011, o diâmetro do embrião não parece ter influenciado a taxa de gestação (gráfico 11 e 12). Quando comparadas as várias categorias de dimensão entre si também não se verificou nenhuma influência.

**Gráfico 11:** Influência do diâmetro do embrião na taxa de gestação no total das épocas reprodutivas.



Barras correspondem a valores médios  $\pm$  desvio padrão. Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). P15= gestação aos 15 dias; P45= gestação aos 45 dias.

**Gráfico 12:** Influência do diâmetro do embrião na taxa de gestação na época reprodutiva de 2010/2011.



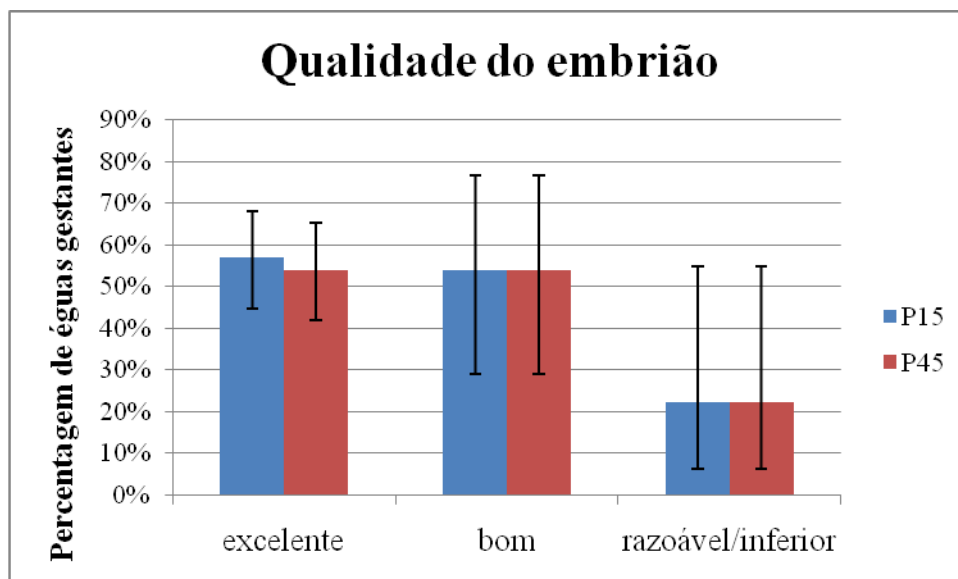
Barras correspondem a valores médios  $\pm$  desvio padrão. Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). P15= gestação aos 15 dias; P45= gestação aos 45 dias.



### 2.3.3 Qualidade morfológica

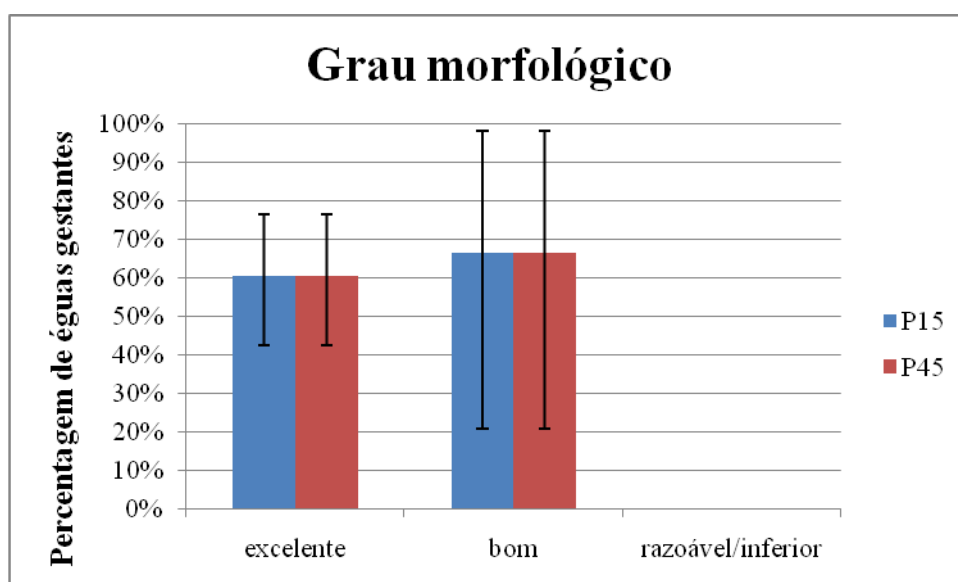
Também a qualidade do embrião na população em causa não influenciou a taxa de gestação, quer no total das épocas reprodutivas quer especificamente na época de 2010/2011 (gráficos 13 e 14)

**Gráfico 13:** Influência da qualidade morfológica do embrião na taxa de gestação no total das épocas reprodutivas.



Barras correspondem a valores médios  $\pm$  desvio padrão. Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). P15= gestação aos 15 dias; P45= gestação aos 45 dias.

**Gráfico 14:** Influência da qualidade morfológica do embrião na taxa de gestação na época reprodutiva de 2010/2011.



Barras correspondem a valores médios  $\pm$  desvio padrão. Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ). P15= gestação aos 15 dias; P45= gestação aos 45 dias.

### 3. Discussão dos resultados

#### 3.1 Época

Os valores obtidos nas taxas de gestação ao longo das três épocas aos 45 dias de gestação, 51,4%, 38,5% e 50% respectivamente, são concordantes com taxas de gestação previamente obtidas (Losinno, 2010). Losinno refere que, sob condições ideais, a taxa de recuperação embrionária gira em torno dos 50 a 80% e a taxa de gestação de 50% a 80% o que determina uma taxa de eficiência total do programa de 25 a 65%. Outros estudos confirmam esses valores, nomeadamente Fleury & Alvarenga em 1999 que obtiveram taxas de gestação de 74,5% aquando de transferências realizadas no dia 7 e Carnevale et al (2000) que apresentaram taxas de gestação aos 50 dias de 57,6% em 1996, 53,1% em 1997 e 55,7% em 1998. No entanto, é difícil realizar uma comparação directa com outros programas de transferência de embriões devido à variabilidade das dadoras, à qualidade e manipulação dos embriões (Carnevale et al, 2000) bem como diferença nas condições meteorológicas e manejo de cada centro.

No presente estudo, a época reprodutiva não influenciou de forma significativa a taxa de gestação. Porém, destaca-se a época de 2009/2010 cuja taxa de gestação é visivelmente mais baixa que nas outras épocas. A época de 2009/2010 foi um ano atípico no que diz respeito à distribuição das chuvas no território onde se localiza o centro. Como se pode verificar pela observação dos mapas de precipitação dos principais meses em que se realizam as transferências, na secção "anexo" da presente dissertação, foi uma época de chuva muito abundante, concentrada em meses que tipicamente são mais secos o que poderá ter influenciado directamente a fisiologia reprodutiva dos animais.

O stress térmico é um factor conhecido na alteração da fisiologia reprodutiva normal dos mamíferos. O Brasil, especificamente na região sudeste de São Paulo onde se localiza a fazenda Santa Rita II, apresenta um clima subtropical, com temperaturas e precipitação elevada na época reprodutiva o que poderá resultar em stress térmico.

Shimizu et al (2005) verificaram que o stress térmico inibe o desenvolvimento folicular dos mamíferos. Compromete, ainda, os eventos reprodutivos ligados à transferência de embriões nomeadamente a expressão do comportamento de estro, provoca alterações do desenvolvimento folicular, na competência oocitária e no desenvolvimento embrionário (Hansen et al, 2001). O stress térmico poderia explicar diferentes taxas de gestação em anos cujas condições meteorológicas fossem aberrantes.

Além disso, uma vez que os animais são mantidos em regime extensivo ou semi-intensivo, as condições meteorológicas influenciam directamente a disponibilidade de alimento na pastagem o que poderia resultar em uma condição corporal diferente.

Henneke et al (1984) observaram que, éguas com uma baixa condição corporal apresentavam taxas de gestação aos 30 dias menores que as éguas com uma boa condição corporal e que o início do estro e das ovulações também estava atrasado nestas éguas.

### 3.2 Factores relacionados com as receptoras

#### 3.2.1 Ovulação do ano

No presente estudo a ovulação do ano (1ª ou subsequentes) não teve influência na taxa de gestação. Este resultado difere de estudos anteriormente realizados. Carnevale et al (2000) verificaram que os embriões transferidos para receptoras na sua primeira ovulação traduziam-se em taxas de gestação significativamente mais elevadas do que embriões transferidos nas ovulações sucessivas (62,6% na primeira ovulação *versus* 54,2% nas seguintes, no dia 50), concluindo que a utilização de receptoras em ciclos anteriores não aumenta a fertilidade em geral. Em outros estudos (Iuliano et al, 1985), a taxa de gestação foi significativamente maior nas ovulações subsequentes. No entanto, neste estudo, a técnica do operador e o meio de preparação do embrião melhoraram ao longo da época o que certamente teve influência nos resultados. No caso da fazenda Santa Rita II, a técnica e a operadora foram sempre as mesmas bem como o meio utilizado para os embriões. O facto desta variável não ter tido influência na taxa de gestação pode estar relacionado com a proporção muito semelhante entre éguas gestantes e não gestantes para receptoras utilizadas na 1ª ovulação (13 éguas gestantes e 14 éguas não gestantes) e nas seguintes (34 éguas gestantes e 31 éguas não gestantes) o que implicaria a utilização de uma dimensão da amostra superior à do estudo.

#### 3.2.2 Tipo de Cio

Muitas vezes as éguas dadoras, dado terem um acompanhamento nutricional e de trabalho mais atento ao das éguas receptoras, começam a ciclar mais cedo na época reprodutiva. Surge, portanto, a necessidade de utilizar receptoras que ainda não estão cíclicas. Na fazenda Santa Rita II utilizou-se de forma positiva receptoras em cio artificial pois não se verificaram diferenças significativas nas taxas de gestação entre estas e receptoras já cíclicas.

Este valor está em concordância com estudos previamente realizados (Carnevale et al, 2000) onde não se verificaram diferenças significativas em relação ao tipo de cio. Porém, no referido estudo, nota-se uma maior proporção de morte embrionária nas éguas em cio

artificial (30% nas éguas em cio artificial versus 14,5% em éguas cíclicas), não sendo o número da amostra suficiente para revelar a existência de alguma diferença significativa.

Na fazenda Santa Rita II, a morte embrionária foi inexistente nas receptoras em cio artificial.

### 3.2.3 Qualidade da receptora

A qualidade da receptora foi definida em "aceitável", "marginal" e "reprovável" consoante as características do útero, nomeadamente a tensão e a morfoecogenicidade entre o miométrio e endométrio. Uma receptora considerada "reprovável" não era utilizada na transferência de embrião, preferindo-se utilizar uma outra que estivesse disponível. É evidente que a qualidade da receptora era considerada um factor crítico no sucesso de um programa de transferência de embriões.

Carnevale et al (2000) verificaram existir diferenças significativas nas taxas de gestação aquando da utilização de uma receptora "aceitável" ou "marginal". A classificação da receptora foi baseada no tónus uterino, no tónus cervical, na morfologia do corpo lúteo e na presença de edema uterino, quistos, fluidos ou ar.

Porém, na presente dissertação, não foi encontrada uma diferença significativa na taxa de gestação entre receptoras "aceitáveis" e "marginais". Este achado poderá estar relacionado com o facto de se ter consciência com base na literatura que existe uma diferença significativa entre as duas receptoras. Deste modo, o número de receptoras "marginais" utilizadas foi reduzido, preferindo-se sempre utilizar uma receptora "aceitável" (apenas 12 receptoras consideradas "marginais" foram utilizadas *versus* 59 receptoras "aceitáveis"). Para se testar verdadeiramente a influência da qualidade das receptoras na taxa de gestação, seria necessário utilizar-se um maior número de receptoras nesta situação.

Apesar de não se ter analisado na presente dissertação, a sincronia entre égua dadora e receptora foi sempre um assunto bastante discutido na literatura. Iuliano et al (1985) concluíram que a sincronia entre égua dadora e receptora não afectou as taxas de gestação. Carnevale et al (2000) verificaram que as receptoras utilizadas mais perto do dia da sua ovulação apresentavam menor probabilidade de sofrer morte embrionária. Apesar da polémica a este respeito, Stout (2006) afirmou que receptoras que ovularam um dia antes ou três dias depois da dadora apresentam maiores taxas de gestação. Esta afirmação é suportada por outros estudos nomeadamente Squires & Siedel, 1995.

### 3.3 Factores relacionados com o embrião

#### 3.3.1 Estádios de desenvolvimento

Na presente dissertação, o estadio de desenvolvimento do embrião não influenciou significativamente as taxas de gestação. No entanto, apenas um total de 7 embriões em 87 correspondiam a blastocistos e blastocistos iniciais, número que pode ser insuficiente para traçar uma conclusão.

Em outros estudos, a taxa de gestação em éguas foi menor em embriões ou mórulas (Carnevale et al, 2000). Estes resultados não indicam necessariamente que a viabilidade de embriões pequenos ou de mórulas seja menor pois nesse estudo todos os embriões foram colhidos dia 7 ou 8 após a ovulação mas que estes embriões teriam um defeito intrínseco de desenvolvimento.

Iuliano et al (1985) avaliaram a influência de embriões recolhidos aos 6, 7 e 8 dias pós-ovulação. Todos os embriões d6 eram blastocistos iniciais e a maior parte dos blastocistos d7 e d8 eram blastocistos expandidos o que está de acordo com o obtido na presente dissertação. À semelhança do verificado na fazenda Santa Rita II, a idade do embrião não teve uma influência significativa nas taxas de gestação. Também Fleury et al (1999) analisaram a influência da recolha do embrião entre o dia 7 e o dia 9 e concluíram não existir uma diferença significativa na taxa de gestação.

#### 3.3.2 Diâmetro do embrião

A influência do diâmetro do embrião pode, por vezes, confundir-se com o estadio de desenvolvimento do mesmo uma vez que embriões menores estão associados a fases iniciais de desenvolvimento (mórulas e blastocistos). No entanto a verdadeira diferença entre um blastocisto inicial e um blastocisto expandido reside na substituição da zona pelúcida por uma camada densa acelular, denominada cápsula (Hudson et al, 2006).

Fleury et al (2002) analisaram a dimensão dos embriões (dimensão menor ou igual a 1000  $\mu\text{m}$  e maior que 1000  $\mu\text{m}$ ) e verificaram não existir uma diferença significativa na taxa de gestação. Já Carnevale et al (2000) verificaram que as taxas de gestação aos 50 dias de embriões muito pequenos (de 100 a 299  $\mu\text{m}$ ) e de embriões muito grandes ( $\leq 2000$   $\mu\text{m}$ ) era significativamente menor do que as médias das taxas de gestação de embriões de dimensões intermédias (47,4% e 42,1% versus 60,8%).

Na presente dissertação, o diâmetro do embrião não influenciou as taxas de gestação. Quando comparadas as diferentes classes das dimensões, também não se registaram diferenças significativas.

### 3.3.3 Qualidade do embrião

A qualidade do embrião afecta não só as taxas de gestação (McKinnon et al, 1988) mas também a incidência de morte embrionária (Carnevale et al, 2000). Carnevale et al (2000) verificaram que embriões grau 3 ou 4 (razoável a mau) prejudicavam de modo significativo as taxas de gestação quando comparados com embriões de grau 1 (excelente) ou 2 (bom) (40% embriões grau 3 e 4 versus 68% embriões grau 1 e 2). Além disso, gestações que resultavam de embriões de grau 2 ou inferior conduziavam mais frequentemente a morte embrionária no dia 50. Anteriormente, Vanderwall (1996) tinha chegado à mesma conclusão: a avaliação morfológica do embrião é o método mais usado na previsão do estabelecimento de uma gestação sendo que a morfologia do embrião influencia significativamente a mesma.

Porém, na dissertação em questão, não se encontraram diferenças significativas na taxas de gestação em embriões de diferente qualidade, apesar dos embriões de grau 1 e 2 apresentarem taxas de gestação superiores aos de grau 3 e 4 no dia 50 de gestação (53,8% versus 22,2% respectivamente). O facto de não se encontrar uma influência significativa poderá estar relacionado com a dimensão da amostra. Seria necessária uma população maior de embriões para que a diferença nas proporções nas taxas de gestação fosse estatisticamente significativa. No entanto do total de embriões recolhidos, 89,7% dos embriões (78 em 87) era de grau 1 ou 2 o que está de acordo com estudos previamente efectuados que afirmam que cerca 90% dos embriões equinos recolhidos são de grau 1 ou 2 (McKinnon et al, 1988). Isto deve-se, pelo menos em parte, ao facto dos embriões que degeneram em fases iniciais do seu desenvolvimento não conseguirem completar o trânsito pelos oviductos.

### 3.4 Outros factores com influência na taxa de gestação após a transferência do embrião

Os factores analisados na presente dissertação foram escolhidos com base em estudos anteriores como aqueles que teriam importância e eventualmente influência significativa nas taxas de gestação. Porém, esta análise não foi exaustiva em relação a todos os factores existentes, seja porque alguns não foram considerados em detrimento de outros, seja pela incapacidade de recolher essa informação. No entanto julgo necessário esclarecer a influência esperada de alguns desses factores nas taxas de gestação e justificar o porquê da sua não inclusão na análise.

#### 3.4.1 Idade das receptoras

A idade das receptoras pode ser considerada uma variável com influência nas taxas de gestação. No entanto, na presente dissertação não foi possível avaliar esse factor uma vez que a idade foi estimada com base no exame dentário dos animais no momento da compra, sendo um factor significativo mais na decisão da compra ou não do animal. Receptoras consideradas idosas foram rejeitadas em detrimento de éguas mais jovens pois a produtividade a longo prazo das receptoras mais novas era obviamente maior. Porém, após a compra do animal, as idades não eram anotadas nas fichas clínicas. A escolha em continuar a utilizar uma receptora ou não baseava-se nas características do seu aparelho reprodutor como por exemplo a eventual presença de quistos, a presença de líquido, a competência do cérvix, o número de partos na fazenda etc.

Deste modo, para que se pudesse utilizar a idade na análise seria necessário realizar um exame dentário a todas as receptoras da fazenda sendo que muitas das receptoras utilizadas em épocas reprodutivas passadas já não se encontravam no centro.

A idade é um importante factor predisponente à degeneração endometrial, podendo comprometer a capacidade de manutenção de uma gestação (Stout, 2006). É necessário, no entanto, referir que Carnevale et al (2000) não encontraram diferenças significativas nas taxas de gestação entre receptoras dos 2 aos 9 anos e dos 10 aos 18 anos. Porém, a taxa de morte embrionária tendia a ser maior no grupo das éguas mais velhas.

#### 3.4.2 Idade das dadoras

Na presente dissertação, a idade da égua dadora não constitui uma variável de análise. Na maioria dos casos tratava-se de éguas mais velhas, cujo potencial genético já tinha sido confirmado pela descendência ou que estavam no final da sua carreira desportiva. Porém, a idade exacta das dadoras era muitas vezes desconhecida. Parte do serviço prestado na fazenda Santa Rita II era ao domicílio, em que existia um médico veterinário que fazia o controlo da dinâmica folicular da égua, realizava a inseminação no momento ideal sendo que a Dr<sup>a</sup>. Maria Augusta Alonso apenas recolhia o embrião, transportava-o até ao centro em refrigeração e transferia-o para a receptora escolhida.

Um estudo realizado em 1989 (Ball et al), compara as taxas de gestação aos dias 4 e 14 após a transferência do embrião para éguas receptoras jovens, ditas normais, idosas e subférteis. Estes autores verificaram que a taxa de gestação era significativamente maior em éguas ditas normais que em éguas idosas e subférteis e que nestas éguas a morte embrionária entre o dia 4 e o dia 14 era significativamente maior. Estes resultados suportam a hipótese de que o aumento nas taxas de morte embrionária resulta de defeitos intrínsecos do embrião.

Carnevale & Ginther (1995) utilizaram um procedimento de transferência de oócitos para compararem a viabilidade dos oócitos/embriões de éguas jovens e idosas. Foi realizado um diagnóstico de gestação ao dia 12 verificando-se que um maior número de oócitos de éguas jovens resultava em vesículas embrionárias quando comparadas com oócitos de éguas idosas (92% versus 31% respectivamente). Estes resultados clarificam que são os defeitos inerentes aos oócitos de éguas idosas os responsáveis por uma redução na viabilidade embrionária uma vez que estes oócitos nunca foram submetidos à genitália tubular da égua dadora.

#### 3.4.3 Tipo de armazenamento do embrião após a recolha

Na fazenda Santa Rita II os embriões eram transferidos imediatamente após a recolha ou, quando recolhidos em locais que não o centro, eram transportados refrigerados em contentor próprio para o efeito.

Um dos principais avanços na transferência de embriões na espécie equina nos últimos anos prende-se com a possibilidade de transportar embriões refrigerados a 5°C até 24h. A refrigeração preserva as células ao reduzir o metabolismo e a divisão celular. (Moya-Araujo, Araujo & Meira, 2010).

No entanto é necessário questionar se o processo de refrigeração tem uma influência significativa nas taxas de gestação. Diversos estudos comprovaram a validade da utilização da refrigeração como um processo de armazenamento do embrião por um tempo limitado.

Fleury et al (2002) realizaram um estudo em que comparavam a influência da aplicação de diferentes períodos de refrigeração em embriões antes da transferência. Os embriões foram subdivididos em <1000 µm ou >1000 µm, não sendo observada diferença significativa nas taxas de gestação entre os grupos ou em relação ao diâmetro dos embriões.

Carnevale et al (2000) verificaram que a taxa de gestação de embriões transferidos imediatamente após a recolha e de embriões refrigerados antes da transferência não era significativamente diferente. No mesmo estudo, comparou-se a incidência de morte embrionária entre o dia 12 e o dia 50 de gestação de embriões frescos e refrigerados e também não se encontraram diferenças significativas. Os resultados confirmam que a refrigeração e o transporte de embriões, quando correctamente realizadas, não influenciam nem as taxas de gestação nem a morte embrionária podendo ser uma ferramenta útil na transferência de embriões.

#### 3.4.4 Tratamento indutor da ovulação

Na fazenda Santa Rita II, utilizavam-se tratamentos indutores da ovulação tanto nas receptoras como nas dadoras. Nas receptoras o objectivo era maximizar a disponibilidade das



mesmas para cada uma das transferências previstas. Nas dadoras, a indução da ovulação prendia-se com a disponibilidade de sémen específico de certos dias e a sincronização com as receptoras. Entre os fármacos utilizados na indução contavam-se a Deslorelina e o hCG.

Apesar de não ter sido considerada uma variável na análise, é importante ter a consciência se o tipo de tratamento indutor tem influência na taxa de gestação e na morte embrionária.

Davis Morel & NewCombe (2008) analisaram a eficácia da hCG em diferentes doses em factores relacionados com a actividade ovárica, nomeadamente a taxa de gestação. Neste trabalho a hCG não mostrou nenhuma influência na taxa de gestação.

Blanchard et al (2002) testaram o efeito da administração de hCG ou deslorelina nas performances reprodutivas no primeiro estro pós-parto das éguas. Verificaram não existirem diferenças significativas nas taxas de gestação entre os dois tratamentos indutores da ovulação (55% hCG versus 64% deslorelina). No entanto, aquando da utilização da deslorelina no pós-parto, verificou-se uma supressão folicular e atraso no retorno ao estro, facto que não se verificou com a hCG. Assim, os autores recomendam a utilização da hCG como tratamento indutor da ovulação no cio do poldro em vez da deslorelina.

## V. Conclusão

No presente estudo os factores relacionados com as éguas receptoras e os embriões equinos foram analisados de modo a determinar qual a sua influência na taxa de gestação após a transferência do embrião. O objectivo consistiu em evidenciar as variáveis de maior influência e, através da sua gestão, otimizar o sucesso do programa de transferência de embriões. No entanto, nenhuma das variáveis analisadas influenciou de modo significativo nas taxas de gestação. Tal não significa que estas não tenham influência mas que na presente situação esta não ocorreu.

Uma das explicações para este facto prende-se com a igualdade das proporções nas taxas de gestação o que implicaria a necessidade de um maior número de transferências para que se pudesse chegar a uma diferença estatisticamente significativa. Apesar de não influenciar significativamente as taxas de gestação, a qualidade da receptora e a qualidade do embrião foram as variáveis que apresentaram maior diferença na proporção de éguas gestantes e não gestantes (69,4% de éguas gestantes "aceitáveis" versus 33,3% de éguas gestantes "marginais" e 53,8% de embriões de grau 1 e 2 versus 22,2% de éguas gestantes de embriões grau 3 e 4). Este achado está de acordo com as referências bibliográficas encontradas como ilustrado na discussão dos resultados, o que pode transmitir uma tendência e potencial influência nas taxas de gestação se a população de transferências analisadas fosse maior.

Apesar de existirem dados bibliográficos que apontam para as variáveis de potencial influência nas taxas de gestação, para cada centro de transferência de embriões, seria necessário realizar um estudo deste género pois as condições de manejo, as ambientais, o tipo de animais usados e embriões adquiridos são todos diferentes pelo que não é possível estabelecer correlações directas entre os programas.

O conhecimento dos factores de influência em cada programa específico é uma ferramenta muito útil na optimização do mesmo pois permite aumentar o número de partos resultantes de transferência de embriões e assim aumentar a credibilidade do programa e maximização dos lucros. Permite, ainda, gerir as expectativas com os proprietários dos animais para que tenham uma ideia mais aproximada da possibilidade de terem um produto resultante de uma transferência. Para isto, a comunicação com o cliente é um factor fundamental.

As éguas candidatas à transferência de embriões são, muitas vezes, éguas que nunca pariram devido à sua carreira desportiva ou que apresentam uma certa idade e consequentemente alterações no aparelho reprodutor. O conhecimento das variáveis de influência permite traçar estratégias e encontrar outras soluções que consigam compensar o decréscimo nas taxas de gestação.

## VI. Bibliografia

- Allen, W.R., Wilsher, S., Tiplady, C. & Butterfield, R.M. (2004). The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth. *Reproduction*, 127 (1), 67-77.
- Allen, W.R. (2005). The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reprod Domest Anim*, 40 (4), 310-29.
- Alonso, M.A (2007). *Efeito das características uterinas e dia do ciclo na taxa de prenhez e níveis séricos de progesterona em éguas candidatas à receptora de embrião*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Botucatu: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
- Alvarenga, M.A., McCue, P.M., Bruemmer, J., Neves Neto J.R. & Squire, E.L. (2001). Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. *Theriogenology*, 56 (5), 879-87.
- Ball, B.A., Hillman, R.B. & Woods, G.L. (1987). Survival of equine embryos transferred to normal and subfertile mares. *Theriogenology*, 28 (2), 167-74.
- Ball, B.A. (1988). Embryonic loss in mares. Incidence, possible causes, and diagnostic considerations. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, 4 (2), 263-90.
- Ball, B.A., Little, T.V., Weber, J.A. & Woods, G.L. (1989). Survival of day-4 embryos from young, normal mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. *J Reprod Fertil.*, 85 (1), 187-94.
- Battut, I., Colchen, S., Fieni, F., Tainturier, D. & Bruyas, J.F. (1997). Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. *Equine Vet J Suppl.*, 25, 60-2.
- Bradecamp, E.A. (2007). Estrous Synchronization. In J.C. Samper (Ed) & J.F. Pycock & A.O. McKinnon, *Current Therapy in Equine Reproduction*. (pp.22-25). Missouri, USA: SAUDERS ELSEVIER.
- Braun, J. (1994). Embryo transfer in horses- current status and future perspectives. *Tierarztl Prax.*, 22 (6), 558-66.
- Bruyas, J.F., Sanson, J.P., Battut, I., Fiéni, F. & Tainturier, D. (2000). Comparison of the cryoprotectant properties of glycerol and ethylene glycol for early (day 6) equine embryos. *J Reprod Fertil Suppl*, 56, 549-60.
- Campos-Chillón, L.F., Suh, T.K., Barcelo-Fimbres, M., Seidel, G.E. Jr. & Carnevale, E.M. (2009). Vitrification of early-stage bovine and equine embryos. *Theriogenology*, 71 (2), 349-54.
- Carnevale, E.M., Squires, E.L. & McKinnon, A.O., (1987). Comparison of Ham's F10 with CO<sub>2</sub> or Hepes buffer for storage of equine embryos at 5 C for 24 H. *J. Anim. Sci.*, 65 (6), 1775-81.

- Carnevale, E.M. & Ginther, O.J. (1995). Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Bio Reprod. Mono Ser.*, 1, 209-214.
- Carnevale, E.M., Uson, M., Bozzola, J.J., King, S.S., Schmitt, S.J., & Gates H.D. (1999). Comparison of oocytes from young and old mares with light and electron microscopy. *Theriogenology*, 51 (1), 299.
- Carnevale, E.M., Ramirez, R.J., Squires, E.L., Alvarenga, M.A., Vanderwall, D.K. & McCue, P.M. (2000). Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, 54 (6), 965-79.
- Carnevale, E.M., Squires, E.L., Maclellan, L.J., Alvarenga, M.A. & Scott, T.J. (2001). Use of oocyte transfer in a commercial breeding program for mares with reproductive abnormalities. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 218 (1), 87-91.
- Carnevale, E.M., Coutinho da Silva, M.A., Panzani, D, Stokes, J.E. & Squires, E.L. (2005). Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology*, 64, (3), 519-27.
- Carnevale, E.M. (2007). Collection and Transfer of Oocytes in Mares. In J.C. Samper (Ed) & J.F. Pycock & A.O. McKinnon, *Current Therapy in Equine Reproduction*. (pp.289-295). Missouri, USA: SAUDERS ELSEVIER.
- Carney, N.J., Squires, E.L., Cook, V.M., Seidel, G.E Jr. & Jasko, D.J. (1991). Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. *Theriogenology*, 36 (1), 23-32.
- Choi, Y.H., Okada, Y., Hochi, S., Braun, J., Sato, K. & Oguri, N. (1994). In vitro fertilization rate of horse oocytes with partially removed zonae. *Theriogenology*, 42 (5), 795-802.
- Choi, Y.H., Velez, I.C., Riera, F.L., Roldán, J.E., Hartman, D.L., Bliss, S.B., Blanchard, T.L, Hayden, S.S. & Hinrichs, K. (2011). Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. *Theriogenology*, 76 (1), 143-52.
- Coutinho da Silva, M.A. (2008). When should a mare go for assisted reproduction? *Theriogenology*, 70 (3), 441-4.
- Cuervo-Arango, J., Aguilar, J. & Newcombe, J.R. (2009). Effect of type of semen, time of insemination relative to ovulation and embryo transfer on early equine embryonic vesicle growth as determined by ultrasound. *Theriogenology*, 71 (8), 1267-75.
- Davies Morel, M.C. & Newcombe, J.R. (2008). The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. *Anim. Reprod. Sci.*, 109 (1-4), 189-99
- Eldridge-Panuska, W.D., di Brienza, V.C., Seidel, G.E. Jr., Squires, E.L. & Carnevale, E.M. (2005). Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology*, 63 (5), 1308-19.

- Ferreira, J.C., Meira, C., Papa, F.O., Landin e Alvarenga F.C., Alvarenga, M.A. & Buratini, J. (1997). Cryopreservation of equine embryos with glycerol plus sucrose and glycerol plus 1,2-propanediol. *Equine Vet. J. Suppl.*, 25, 88-93.
- Fleury, J.J. & Alvarenga, M.A. (1999). Effects of collection day on embryo recovery and pregnancy rates in a nonsurgical equine embryo transfer program. *Theriogenology*, 51 (1), 261.
- Fleury, J.J., Fleury, P.D.C. & Alvarenga, M.A. (2002). Effect of embryo diameter and storage period on pregnancy rates obtained with equine embryos stored in Ham's F-10 with Hepes Buffer at a temperature of 15–18 °C—preliminary results. *Theriogenology*, 58 (1-2), 749-750.
- Flood, P.F., Jong, A. & Betteridge, K.J. (1979). The location of eggs retained in the oviducts of mares. *J. Reprod. Fertil.*, 57 (2), 291-4.
- Handler, J., Königshofer, M., Kindahl, H., Schams, D. & Aurich, C. (2003). Secretion patterns of oxytocin and PGF $\alpha$ -metabolite in response to cervical dilatation in cyclic mares. *Theriogenology*, 59 (5-6), 1381-91.
- Hansen, P.J., Drost, M., Rivera, R.M., Paula-Lopes, F.F., al-Katanani, Y.M., Krininger, C.E. 3rd & Chase, C.C. Jr. (2001). Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*, 55 (1), 91-103.
- Henneke, D., Potter, G. & Kreider, J. (1984). Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. *Theriogenology*, 21 (6), 897 – 909.
- Higgins, A.J. & Lees, P. (1984). The acute inflammatory process, arachidonic acid metabolism and the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Equine Vet. J.*, 16 (3), 163-75.
- Hinrichs, K., Sertich, P.L., Palmer, E. & Kenney, R.M. (1987). Establishment and maintenance of pregnancy after embryo transfer in ovariectomized mares treated with progesterone. *J. Reprod. Fertil.*, 80 (2), 395-401.
- Hinrichs, K. (1990). Work in progress: A simple technique that may improve the rate of embryo recovery on uterine flushing in mares. *Theriogenology*, 33 (5), 937-42.
- Hinrichs, K. & Choi, Y.H. (2005). Assisted reproductive techniques in the horse. *Clin. Tech. Equine Pract.*, 4, 210-8.
- Hinrichs, K. (2005). Update on equine ICSI and cloning. *Theriogenology*, 64 (3), 535-41.
- Hinrichs, K. (2007). In Vitro Fertilization. In J.C. Samper (Ed) & J.F. Pycocock & A.O. McKinnon, *Current Therapy in Equine Reproduction*. (pp.308-309). Missouri, USA: SAUDERS ELSEVIER.
- Holyoak, G.R. & Ley, W.B. (2007). Management Regimens for Uterine Cysts. In J.C. Samper (Ed) & J.F. Pycocock & A.O. McKinnon, *Current Therapy in Equine Reproduction*. (pp.22-25). Missouri, USA: SAUDERS ELSEVIER.

- Hudson, J., McCue, P.M., Carnevale, E.M., Welch, S. & Squires, E.L. (2006). The effects of cooling and vitrification of embryos from mares treated with equine follicle-stimulating hormone on pregnancy rates after nonsurgical transfer. *J. Equine Vet. Sci.*, 26 (2), 51-54.
- Hudson, J.J. & McCue, P.M. (2004). How to increase embryo recovery rates and transfer success. *Proc. AAEP*, 50, 406-408.
- Imel, K.J., Squires, E.L., Elsdon, R.P. & Shideler, R.K. (1981). Collection and transfer of equine embryos. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 179 (10), 987-91.
- Iuliano, M.F., Squires, E.L. & Cook, V.M. (1985). Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. *J. Anim. Sci.*, 60 (1), 258-63.
- Jacob, J.C., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Carvalho, G.R., Beg, M.A. & Ginther, O.J. (2009). Follicle deviation in ovulatory follicular waves with one or two dominant follicles in mares. *Reprod. Domest. Anim.*, 44 (2), 248-54.
- Jasko, D.J. (2002). Comparison of pregnancy rates following non-surgical transfer of day 8 embryos using various transfer devices. *Theriogenology*, 58, 713-716.
- Kask, K., Odensvik, K. & Kindahl, H. (1997). Prostaglandin F2alpha release associated with an embryo transfer procedure in the mare. *Equine Vet. J.*, 29 (4), 286-9.
- Kaspar, B., Kähn, W., Laging, C. & Leidl, W. (1987). Endometrial cysts in the mare. 1. Post-mortem studies: occurrence and morphology. *Tierarztl. Prax.*, 15 (2), 161-6.
- Legrand, E., Bencharif, D., Barrier-Battut, I., Delajarraud, H., Corniere, P., Fieni, F., et al. (2002). Comparison of pregnancy rates for days 7–8 equine embryos frozen in glycerol with or without previous enzymatic treatment of their capsule. *Theriogenology*, 58, 721-723.
- Logan, N.L., McCue, P.M., Alonso, M.A. & Squires, E.L. (2007). Evaluation of three equine FSH superovulation protocols in mares. *Anim. Reprod. Sci.*, 102 (1-2), 48-55.
- Losinno, L. (2010). Transferencia embrionaria en equinos. Acedido em Jan. 18, 2011, disponível em [http:// www.congresoreproequina.com.ar/pdf/biotecnologias\\_yeguas.pdf](http://www.congresoreproequina.com.ar/pdf/biotecnologias_yeguas.pdf)
- Meyers-Brown, G.A., McCue, P.M., Niswender, K.D., Squires, E.L. & DeLuca, C.A. (2010). Superovulation in Mares Using Recombinant Equine Follicle Stimulating Hormone: Ovulation Rates, Embryo Retrieval, and Hormone Profiles. *J. Equine Vet. Sci.*, 30 (10), 560-568.
- McCue, P.M., Scoggin, C.F., Meira, C. & Squires, E.L. (2000). Pregnancy rates for equine embryos cooled for 24 h in Ham's F-10 versus EmCare embryo holding solution. In: *Proceedings of the Annual Conference of Society of Theriogenology*, 147.
- McCue, P.M., Niswender, K.D. & Macon, K.A. (2003). Modification of the flush procedure to enhance embryo recovery. *J. equine vet. sci.*, 23, 336-337.
- McKinnon, A.O., Carnevale, E.M., Squires, E.L., Voss, J.L. & Seidel, G.E Jr. (1988). Heterogenous and xenogenous fertilization of in vivo matured equine oocytes. *J. Equine Vet. Sci.*, 8(2), 143-147.

- McKinnon, A.O. & Squires, E.L. (1988). Equine embryo transfer. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 4, 305-333.
- McKinnon, A.O., Brown, R.W., Pashen, R.L., Greenwood, P.E. & Vasey, J.R. (1992). Increased ovulation rates in mares after immunisation against recombinant bovine inhibin alpha-subunit. *Equine Vet. J.*, 24 (2), 144-6.
- McKinnon, A.O. & Squires, E.L. (2007). Embryo Transfer and Related Technologies. In J.C. Samper (Ed) & J.F. Pycock & A.O. McKinnon, *Current Therapy in Equine Reproduction*. (pp.319-333). Missouri, USA: SAUDERS ELSEVIER.
- McKinnon, AO. Embryo transfer. acedido em Jan. 26, 2011, disponível em [http://www.gvequine.com.au/Embryo\\_Transfer.htm](http://www.gvequine.com.au/Embryo_Transfer.htm)
- Moussa, M., Tremoleda, J.L., Duchamp, G., Bruyas, J.F., Colenbrander, B., Bevers, M.M. & Daels, P.F. (2004). Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5 degrees C. *Theriogenology*, 61 (5), 921-32.
- Moya-Araujo, C.F., Araujo, G.H.M. & Meira, C. (2010). Avanços na criopreservação de embriões equinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 34 (1), 58-66.
- Niswender, K. D., Alvarenga, M.A., McCue, P.M., Hardy, Q.P. & Squires, E.L. (2003). Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). *J. Equine Vet. Sci.*, 23 (11), 497-500.
- Ousey, J.C., Rossdale, P.D., Fowden, A.L., Palmer, L., Turnbull, C. & Allen, W.R. (2004). Effects of manipulating intrauterine growth on post natal adrenocortical development and other parameters of maturity in neonatal foals. *Equine Vet. J.*, 36 (7), 616-21.
- Palmer, E., Bézard, J., Magistrini, M. & Duchamp, G. (1991). In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 44, 375-84.
- Pycock, J.F. (2007). Therapy for Mares With Uterine Fluid. In J.C. Samper (Ed) & J.F. Pycock & A.O. McKinnon, *Current Therapy in Equine Reproduction*. (pp.93-104). Missouri, USA: SAUDERS ELSEVIER.
- R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Regulamento do livro genealógico do Cavalo Lusitano (2010) anexo V, artigos 15º a 17º. Acedido em Jan. 25, 2011, disponível em <http://www.cavalo-lusitano.com/apsl/regulamento-do-livro-genealogico/>
- Robinson, S.J., Neal, H. & Allen, W.R. (2000). Modulation of oviductal transport in mares by local application of prostaglandin E2. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 56, 587-92.
- Rosas, C.A., Alberio, R.H., Barañao, J.L., Agüero, A. & Chaves, M.G. (1998). Evaluation of two treatments in superovulation of mares. *Theriogenology*, 49(7), 1257-64.

- Shimizu, T., Ohshima, I., Ozawa, M., Takahashi, S., Tajima, A., Shiota, M., Miyazaki, H. & Kanai, Y. (2005). Heat stress diminishes gonadotropin receptor expression and enhances susceptibility to apoptosis of rat granulosa cells. *Reproduction*, 129 (4), 463-72.
- Squires, E.L., Garcia, R.H. & Ginther, O.J. (1985). Factors affecting the success of equine embryo transfer. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 44, 714-716.
- Squires, E.L., Garcia, R.H., Ginther, O.J., Voss, J.L. & Seidel, G.E. Jr. (1986). Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. *Theriogenology*, 26(5), 661-70.
- Squires, E.L., McClain, M.G., Ginther, O.J. & McKinnon, A.O. (1987). Spontaneous multiple ovulation in the mare and its effect on the incidence of twin embryo collections. *Theriogenology*, 28 (5), 609-13.
- Squires, E. & Seidel, G. (1995). Collection and transfer of equine embryos. Fort Collins, Colorado: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory – Colorado State University.
- Squires, E.L., Carnevale, E.M., McCue, P.M. & Bruemmer, J.E. (2003). Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*, 59 (1), 151-70.
- Squires, E.L. (2005). Integration of future biotechnologies into the equine industry. *Anim. Reprod. Sci.*, 89 (1-4), 187-98.
- Squires, E.L. (2006). Superovulation in mares. *Vet. Clin. North Am. Equine. Pract.*, 22 (3), 819-30.
- Stout, T.A., Lamming, G.E. & Allen, W.R. (1999). Oxytocin administration prolongs luteal function in cyclic mares. *J. Reprod. Fert.*, 116 (2), 315-20.
- Stout, T.A., Meadows, S. & Allen, W.R. (2005). Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. *Anim. Reprod. Sci.*, 87(3-4), 269-81.
- Stout, T.A. (2006). Equine embryo transfer: review of developing potential. *Equine Vet. J.*, 38 (5), 467-78.
- Troedsson, M.H., Loset, K., Alghamdi, A.M., Dahms, B., & Crabo, B.G. (2001). Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 68 (3-4), 273-8.
- Vanderwall, D.K. (1996). Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, 12 (1), 61-83.
- Vanderwall, D.K., Hyde, K.J. & Woods, G.L. (2006). Effect of repeated transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration on fertility in mares. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 228 (2), 248-50.
- Vanderwall, D.K. & Newcombe, J.R. (2007). Early Embryonic Loss. In J.C. Samper (Ed) & J.F. Pycok & A.O. McKinnon, *Current Therapy in Equine Reproduction*. (pp.374-388). Missouri, USA: SAUNDERS ELSEVIER.



Wilsher, S. & Allen, W.R. (2004). An improved method for non-surgical embryo transfer in the mare. *Equine vet. edu.*, 16, 39-44.

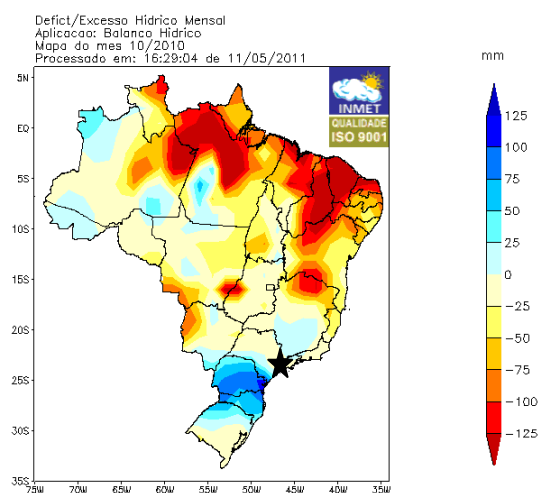
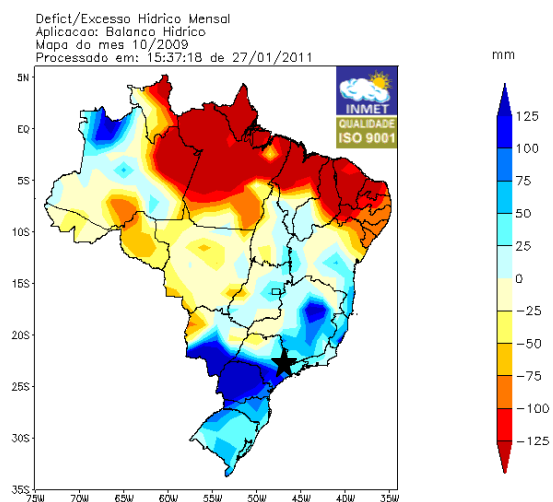
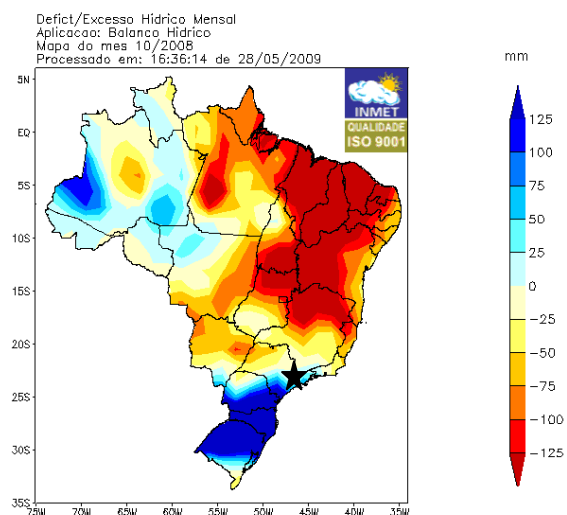
Wilsher, S., Kölling, M. & Allen, W.R. (2006). Meclofenamic acid extends donor-recipient asynchrony in equine embryo transfer. *Equine Vet. J.*, 38 (5), 428-32.

Woods, G.L. & Ginther, O.J. (1984). Collection and transfer of multiple embryos in the mare. *Theriogenology*, 21 (3), 461-469.

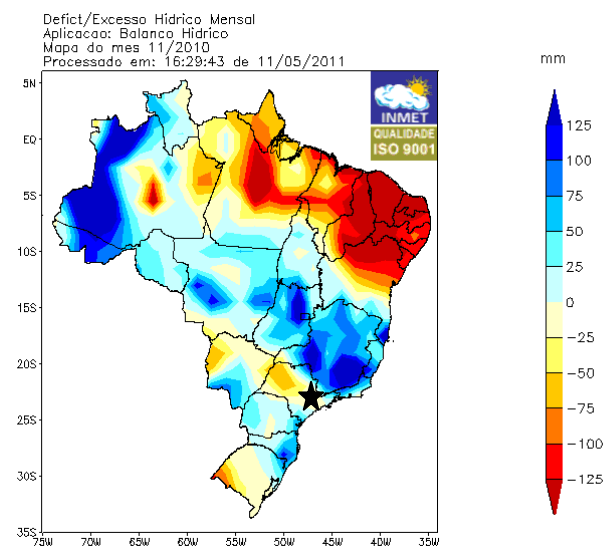
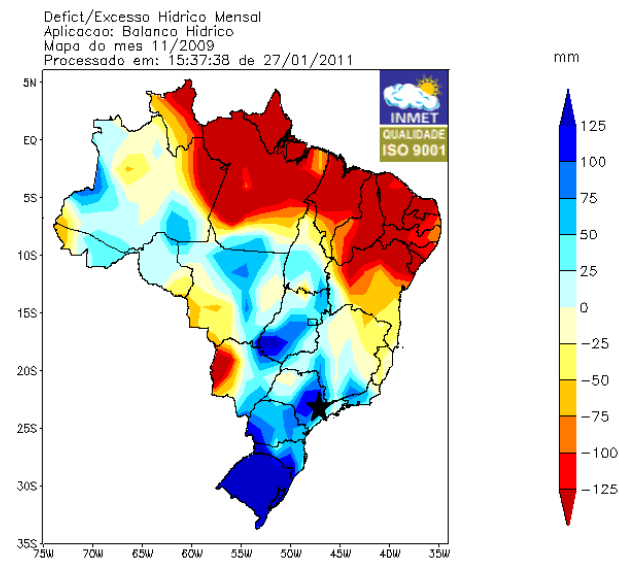
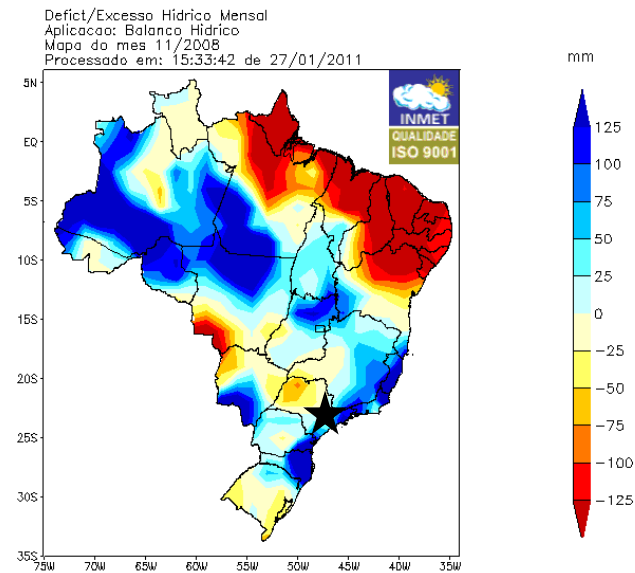
## VII. Anexos

★ Simboliza a posição aproximada de Piracaia no mapa.

### Outubro

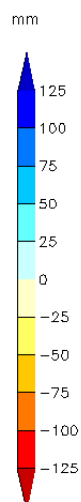
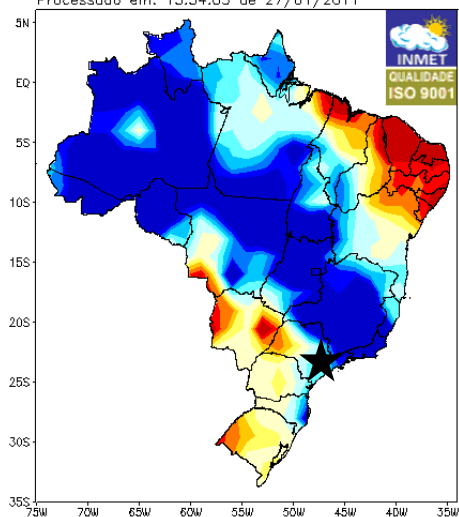


## Novembro

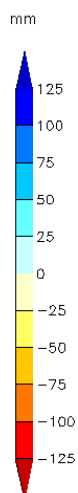
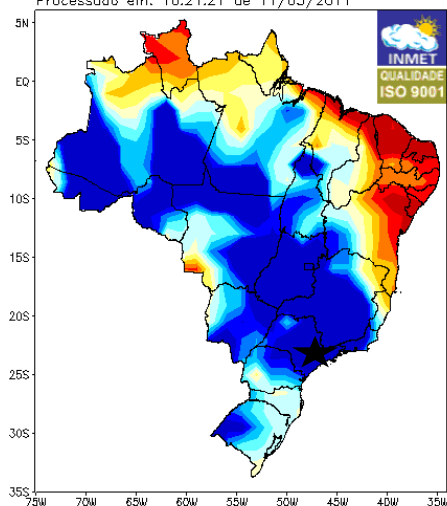


## Dezembro

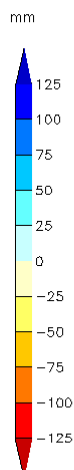
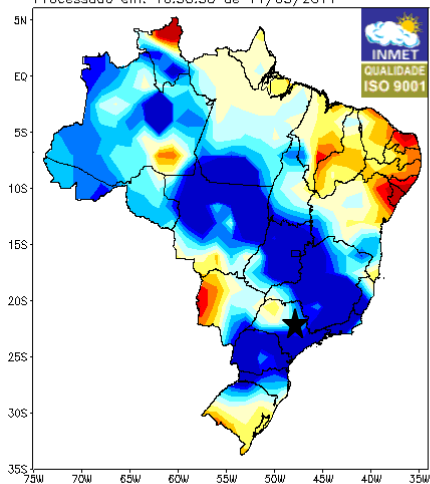
Deficit/Excesso Hídrico Mensal  
Aplicação: Balanço Hídrico  
Mapa do mês 12/2008  
Processado em: 15:34:05 de 27/01/2011



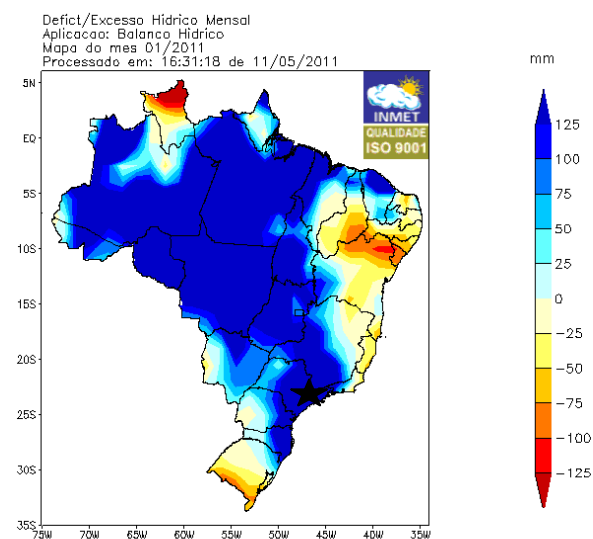
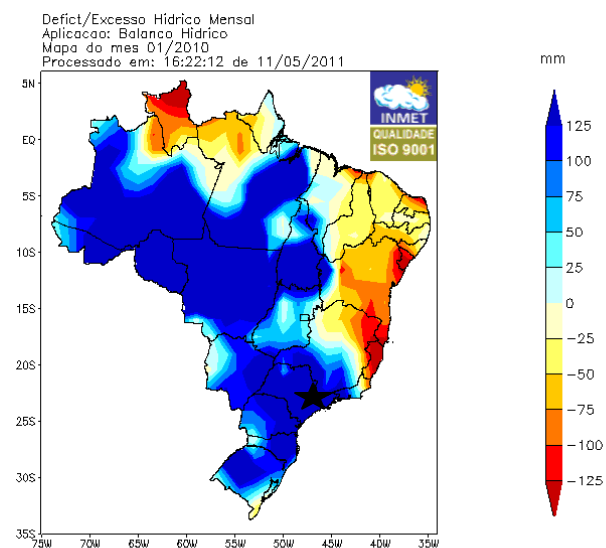
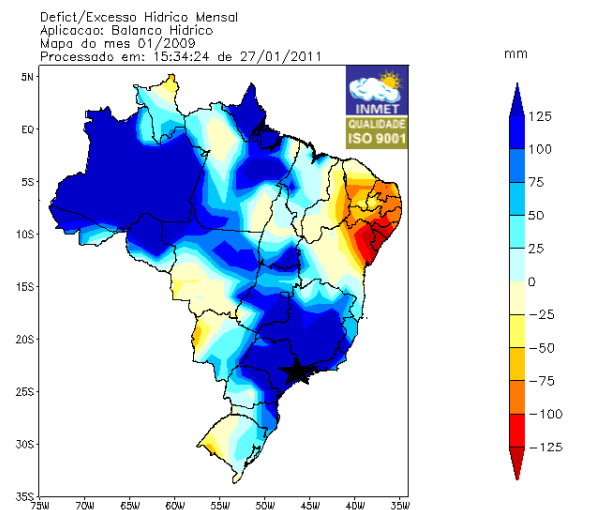
Deficit/Excesso Hídrico Mensal  
Aplicação: Balanço Hídrico  
Mapa do mês 12/2009  
Processado em: 16:21:21 de 11/05/2011



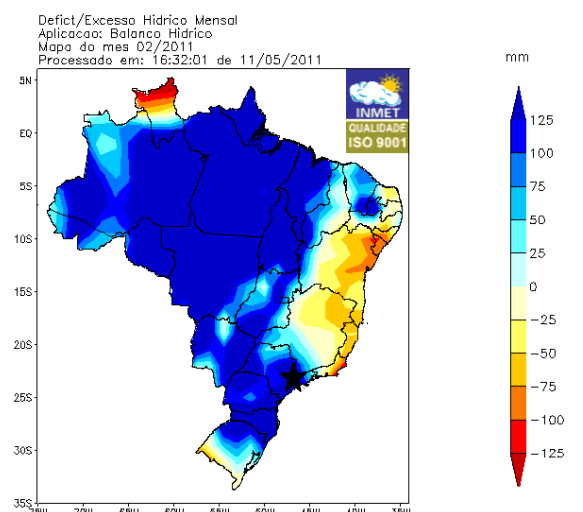
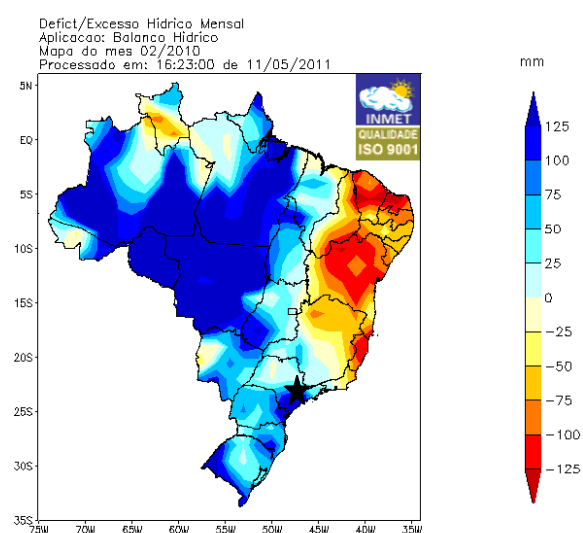
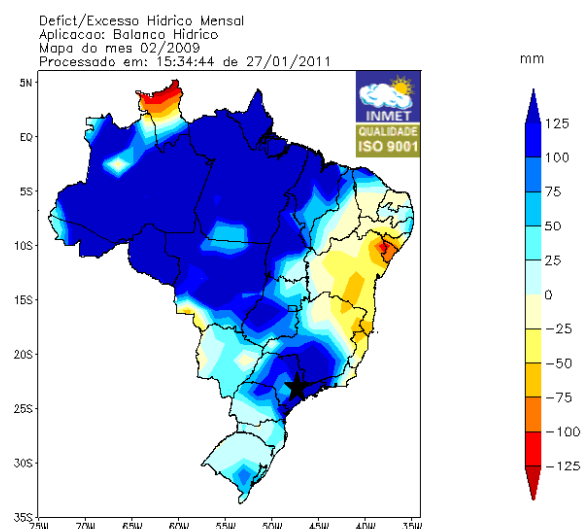
Deficit/Excesso Hídrico Mensal  
Aplicação: Balanço Hídrico  
Mapa do mês 12/2010  
Processado em: 16:30:30 de 11/05/2011



## Janeiro



## Fevereiro



## Março

